

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARCOS PAULO ROSA

**PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E COMPOSTOS COM ATIVIDADE  
BIOLÓGICA POR *Acutodesmus obliquus***

CURITIBA  
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARCOS PAULO ROSA

**PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E COMPOSTOS COM ATIVIDADE  
BIOLÓGICA POR *Acutodesmus obliquus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Mecânica.

Orientador: Prof. Dr. José Viriato Coelho Vargas

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vanessa Kava

CURITIBA  
2017

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR  
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

---

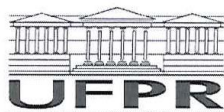
- R788p      Rosa, Marcos Paulo  
              Produção de hidrogênio e compostos com atividade biológica por  
              *Tetrademus Obliquus* (= *Acutodesmus obliquus*) / Marcos Paulo Rosa. –  
              Curitiba, 2017.  
              86 f. : il. color. ; 30 cm.
- Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia,  
              Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, 2017.
- Orientador: José Viriato Coelho Vargas – Coorientador: Vanessa Kava.  
              Bibliografia: p. 73-86.
1. Hidrogênio como combustível. 2. DNA recombinante. 3. *Acutodesmus*. I.  
              Universidade Federal do Paraná. II. Vargas, José Viriato Coelho. III. Kava,  
              Vanessa. IV. Título.

CDD: 541.372

---

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894

## TERMO DE APROVAÇÃO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Setor TECNOLOGIA  
Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA MECÂNICA

### TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA MECÂNICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **MARCOS PAULO ROSA** intitulada: **PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO E COMPOSTOS COM ATIVIDADE BIOLÓGICA POR ACUTODESMUS OBLIQUUS**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 28 de Setembro de 2017.

  
JOSE VIRIATO COELHO VARGAS  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

  
LUIZ ALBERTO DE OLIVEIRA ROCHA  
Avaliador Externo (UFRGS)

  
ANDRE BELLIN MARIANO  
Avaliador Externo (UFPR)

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Dr. José Viriato Coelho Vargas, pela orientação, apoio, incentivos e confiança.

A professora Dr<sup>a</sup> Vanessa Kava, pela orientação, confiança, acolhida e incentivo em todos os momentos no andamento deste trabalho.

A Dr<sup>a</sup> Daiani Cristina Savi, pelo auxílio, confiança, risadas, confidências e principalmente por todo o incentivo e apoio.

Aos colegas do LabGeM – Laboratório de Genética de Microorganismos, pela amizade, companheirismo e pela colaboração na realização deste trabalho.

Aos colegas do NPDEAS – Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável, pela amizade, companheirismo e pela colaboração na realização deste trabalho.

As Professoras Dr.<sup>a</sup> Lygia Vitória Galli-Terasawa e Chirlei Glienke pela convivência, sugestões e auxílio dentro e fora do LabGeM.

Aos Professores do PGMec - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, que contribuíram para minha formação.

A Dr<sup>a</sup> Lisandra Santos Ferreira Maba pelo apoio técnico na aquisição de imagens em microscopia, além do apoio moral e incentivo em todos os momentos.

A prof<sup>a</sup> Mabel Karina Arantes Alves, do Campus Palotina pelo suporte e apoio em análises técnicas.

Ao prof Dr. Helton José Alves, do Campus Palotina pelo suporte e apoio em análises técnicas.

Ao técnico e amigo Rodrigo Aluizio, pelo apoio no laboratório e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Fernando Gallego Dias pela amizade, parceria e colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

A colega e Doutoranda Beatriz Santos pela amizade, parceria e colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao colega e Mestre Diego Araujo de Lima pela amizade, parceria e colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

A colega de laboratório Francielly Maria Wilke Ramos Gos, pela amizade, parceria e colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos demais colegas que de uma forma contribuíram no desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos da graduação Amanda Noronha, Amid Tony Ibrahim, Anna Paula Cruz Garcia, Emanuelle de Almeida, Lohana Renoste e Marcela Murasse, pelo incentivo, apoio e carinho que me foi dado.

A amiga Elisa do Amaral, por toda a compreensão e parceria em todos os momentos durante esta etapa acadêmica.

A minha família pelo apoio, incentivo e compreensão em todas os momentos que precisei me dedicar a conclusão desta etapa.

A Capes e a Fundação Araucária, pelo auxílio financeiro.

*"Noventa por cento do sucesso se baseia simplesmente em insistir."*  
(Woody Allen)

## RESUMO

Microalgas possuem um elevado potencial biotecnológico como fonte de biocombustíveis (biodiesel, biohidrogênio) ou ainda como fonte de outros produtos de elevado valor agregado (produtos farmacêuticos, proteínas, pigmentos entre outros). No entanto, para que o cultivo de microalgas possa ser economicamente competitivo com outras fontes de combustível faz-se necessário a aplicação do conceito de biorrefinaria - instalações produtivas que geram e utilizam matéria prima de origem biológica, operando de forma totalmente integrada. Esta parece ser a estratégia mais acertiva para alcançar a viabilidade do processo de produção. Portanto, os objetivos deste estudo foram isolar e identificar a principal linhagem de microalga utilizada para a produção de biocombustíveis no NPDEAS, utilizando a sequência de rDNA e análise micromorfológica, e avaliar o potencial desta linhagem na produção de hidrogênio e co-produtos com atividade biológica. Para a purificação da linhagem (LGMM0001), uma alíquota foi semeada em meio de cultivo CHU sólido e uma colônia isolada foi selecionada e mantida em meio CHU líquido. O DNA genômico foi purificado utilizando kit comercial (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha), para identificação molecular, a região ITS (ITS1, 5,8S e ITS2) (*Internal Transcribed Spacer*) foi amplificada e sequenciada utilizando os iniciadores LS266 e V9G. A caracterização morfológica foi realizada utilizando o microscópio Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Jena, DE). A avaliação da produção de hidrogênio foi realizada seguindo a metodologia de Hemschemeier *et al.* (2009), todo o procedimento foi feito em duplicata. Por fim, para a pesquisa de atividade biológica, os metabólitos secundários foram extraídos por fracionamento com acetato de etila e clorometano, concentrados e avaliados contra bactérias de interesse clínico. Através de análises de microscopia, foram observadas características gerais compartilhadas pelos gêneros *Scenedesmus* e *Acutodesmus*. A plasticidade das características morfológicas desses gêneros reforça a necessidade de mais estudos para a correta classificação das espécies neste grupo utilizando sequenciamento de DNA. A análise da sequência ITS mostrou 100% de homologia com sequências da espécie *Acutodesmus obliquus*, e a linhagem (LGMM0001) foi classificada como pertencendo a esta espécie. A linhagem de microalgas avaliada foi capaz de produzir hidrogênio, mostrando resultados positivos para a formação do gás, com produção máxima para a linhagem isolada em  $68,66 \pm 5,01 \text{ mg/m}^3$ . Assim como para a atividade biológica dos extratos obtidos a partir das fases de cultivo, a qual apresentou o melhor resultado com o extrato obtido do cultivo residual realizado com meio alternativo utilizado nos FBRs do NPDEAS, frente a linhagem patogênica *S. aureus*. Em conclusão, a linhagem de microalga utilizada neste trabalho foi caracterizada como *Tetradescmus obliquus* (= *Acutodesmus obliquus*), e foi capaz de produzir compostos com potencial econômico em associação com o processo de produção de biocombustíveis.

Palavras chaves: *Acutodesmus*, hidrogênio, sequência de rDNA, biorrefinaria, atividade biológica.



## ABSTRACT

Microalgae have a high biotechnological potential as a source of biofuels (biodiesel, biohydrogen) or as a source of other products with high added value (pharmaceuticals, proteins, pigments among others). However, for microalgae cultivation to be economically competitive with other fuel sources, it is necessary to apply the concept of biorefinery - production facilities that generate and use raw material of biological origin, operating in a totally integrated way. This seems to be the most ambitious strategy to achieve the viability of the production process. Therefore, the objectives of this study were to isolate and identify the main microalgae line used to produce biofuels in NPDEAS using the rDNA sequence and micromorphological analysis and to evaluate the potential of this lineage in the production of hydrogen and co-products with biological activity. For the purification of the lineage (LGMM0001), an aliquote was seeded into solid CHU culture medium and an isolated colony was selected and maintained in liquid CHU medium. The genomic DNA was purified using commercial kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) for molecular identification, the ITS region (ITS1, 5.8S and ITS2) (Internal Transcribed Spacer) was amplified and sequenced using primers LS266 and V9G. Morphological characterization was performed using the Axio Imager Z2 microscope (Carl Zeiss, Jena, DE). The evaluation of the hydrogen production was carried out following the methodology of Hemschemeier and co-workers (2009), the entire procedure was done in duplicate. Finally, for biological activity research, secondary metabolites were extracted by fractionation with ethyl acetate and chloromethane, concentrated and evaluated against bacteria of clinical interest. Through microscopic analysis, general characteristics shared by the genus *Scenedesmus* and *Acutodesmus* were observed. The plasticity of the morphological characteristics of these genera reinforces the need for further studies to correctly classify the species in this group using DNA sequencing. ITS sequence analysis showed 100% homology with sequences from the *Acutodesmus obliquus* species. The lineage (LGMM0001) was classified as belonging to this species. The microalgae line evaluated was able to produce hydrogen, showing positive results for gas formation, with maximum production for the isolated line at  $68,66 \pm 5,01 \text{ mg/m}^3$ . As for the biological activity of the extracts obtained from the cultivation phases, which presented the best result with the extract obtained from the residual culture carried out with alternative medium used in the NPDEAS FBRs, against the *S. aureus* pathogenic lineage. In conclusion, the microalgae line used in this work was characterized as *Tetradesmus obliquus* (= *Acutodesmus obliquus*), and was able to produce compounds with economic potential in association with the biofuel production process.

**Key-words:** *Scenedesmus*, *Acutodesmus*, *hydrogen*, *rDNA sequence*, *biorefinery*, *biological activity*.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	AS POSSIBILIDADES EXISTENTES PARA SE OBTER ENERGIA A PARTIR DE BIOMASSA MICROALGAL.....	17
FIGURA 2 -	ESQUEMA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS EM CÉLULA DE MICROALGA VERDE DURANTE A FOTOSSÍNTESE.....	28
FIGURA 3 -	APLICAÇÕES DE MICROALGAS NO CONCEITO DE BIOREFINARIA.....	30
FIGURA 4 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS PROCESSOS DESENVOLVIDOS NO NPDEAS.....	31
FIGURA 5 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA METODOLOGIA APLICADA PARA A IDENTIFICAÇÃO DA LINHAGEM DE MICROALGA UTILIZADA NOS FBR'S DO NPDEAS.....	34
FIGURA 6 -	ESQUEMA DA ESTRUTURA DA REGIÃO ITS, INDICANDO OS PRIMERS QUE SÃO MAIS COMUMENTE UTILIZADOS EM DIAGNÓSTICOS DE HUMANOS E FUNGOS.....	36
FIGURA 7 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA METODOLOGIA APLICADA PARA A PRODUÇÃO DE EXTRATOS E INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	38
FIGURA 8 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA METODOLOGIA APLICADA PARA A IDENTIFICAÇÃO DA LINHAGEM DE MICROALGA UTILIZADA NOS FBR'S DO NPDEAS.....	41
FIGURA 9 -	ESQUEMA DA MONTAGEM DO EXPERIMENTO PARA PRODUÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE HIDROGÊNIO.....	43
FIGURA 10 -	IMAGENS OBTIDAS EM MICROSCOPIA DAS LINHAGENS DE MICROALGAS ISOLADAS.....	44
FIGURA 11 -	DNA GENÔMICO DOS 4 MORFOTIPOS DAS LINHAGENS DE MICROALGAS PROVENIENTES DO INÓCULO DO NPDEAS.....	45
FIGURA 12 -	PRODUTO DA REAÇÃO DE PCR DOS 4 MORFOTIPOS DA LINHAGEM DE MICROALGA PROVENIENTES DO INÓCULO DO NPDEAS.....	46
FIGURA 13 -	ÁRVORE FILOGENÉTICA DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA (ML) CONSTRUÍDA A PARTIR DE DADOS DE SEQUÊNCIAS QUE ABRANGEM REGIÕES DE DNA RIBOSSOMAL ITS1, 5.8S E ITS2.....	47
FIGURA 14 -	RENDIMENTO MÁSSICO DOS EXTRATOS OBTIDOS COM OS MEIOS DE CULTIVO CHU, TAP E CULTIVO EM MEIO ALTERNATIVO.....	49
FIGURA 15 -	GRÁFICOS REFERENTES AS MÉDIAS DOS VALORES DOS HALOS DE INIBIÇÃO PARA CADA LINHAGEM DE PATÓGENOS CLÍNICO.....	53
FIGURA 16 -	GRÁFICOS REFERENTES AS MÉDIAS DOS VALORES DOS HALOS DE INIBIÇÃO PARA CADA LINHAGEM DE PATÓGENOS	

	CLÍNICO.....	54
FIGURA 17 -	GRÁFICO REFERENTE A MÉDIA DOS VALORES DOS HALOS DE INIBIÇÃO PARA CADA MEIO DE CULTIVO E FASE DE CULTIVO E A RESPECTIVA LINHAGEM DE PATÓGENO CLÍNICO UTILIZADA NO TESTE.....	55
FIGURA 18 -	GRÁFICOS REFERENTES AS MÉDIAS DOS VALORES DOS HALOS DE INIBIÇÃO PARA O PATÓGENO CLÍNICO MAB1 EM RELAÇÃO AOS PATÓGENOS CLÍNICOS MAB (2, 3, 5, 7, 8, 9).....	56
FIGURA 19 -	GRÁFICOS REFERENTES AS MÉDIAS DOS VALORES DOS HALOS DE INIBIÇÃO PARA O PATÓGENO CLÍNICO MAB4 EM RELAÇÃO AOS PATÓGENOS CLÍNICOS MAB (2, 3, 5, 7, 8, 9).....	57
FIGURA 20 -	GRÁFICOS REFERENTES AS MÉDIAS DOS VALORES DOS HALOS DE INIBIÇÃO PARA O PATÓGENO CLÍNICO MAB10 EM RELAÇÃO AOS PATÓGENOS CLÍNICOS MAB (2, 3, 5, 7, 8, 9).....	58
FIGURA 21 -	VALORES OBTIDOS COM OS EXPERIMENTOS UTILIZANDO A LINHAGEM DE <i>Tetrademus obliquus</i> (=Acutodesmos obliquus) e <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	63
FIGURA 22 -	COMPARAÇÃO ENTRE MODELO MATEMÁTICO DE PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO AJUSTADO E VALORES EXPERIMENTAIS PARA <i>Tetrademus obliquus</i> (=Acutodesmos obliquus) e <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (CC125).....	63

## LISTAS DE TABELAS

TABELA 1 - PATÓGENOS CLÍNICOS UTILIZADOS NO TESTE DE DIFUSÃO EM DISCO COM OS EXTRATOS PRODUZIDOS A PARTIR DO CULTIVO DE MICROALGAS.....	23
TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO CHU.....	33
TABELA 3 - PATÓGENOS CLÍNICOS UTILIZADOS NO TESTE DE DIFUSÃO EM DISCO E OS RESPECTIVOS ANTIBIÓTICOS DE AÇÃO COMPROVADA.....	40
TABELA 4 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO TAP (TRIS-ACETATE-PHOSPHATE).....	42
TABELA 5 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO TAP-S (TRIS-ACETATE-PHOSPHATE FREE EN SULFUR).....	42
TABELA 6 - RESULTADOS OBTIDOS EM QUANTIFICAÇÃO POR NANODROP, E DILUIÇÃO APLICADA.....	45
TABELA 7 - RENDIMENTO MÁSSICO DOS EXTRATOS OBTIDOS COM OS MEIOS DE CULTIVO CHU, TAP E CULTIVO EM MEIO ALTERNATIVO.....	48
TABELA 8 - IMAGENS DO TESTE DE DIFUSÃO EM DISCO REALIZADO COM EXTRATOS METABÓLICOS.....	49
TABELA 9 - VALORES DE HALOS DE INIBIÇÃO PARA TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE MICROALGAS PRODUZIDOS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO FRENTE A PATÓGENOS CLÍNICOS.....	52
TABELA 10 - DADOS OBTIDOS APÓS 48 HORAS DE TRATAMENTO, NO EXPERIMENTO DE EXTRATO DE BIOMASSA DE MICROALGA CULTIVADO EM MEIO ALTERNATIVO.....	60
TABELA 11 - CONVERSÃO DOS VALORES EM FUNÇÃO LOGARÍTMICA E OBTENÇÃO DOS VALORES PROBABILÍSTICOS.....	60
TABELA 12 - VALORES DE CONCENTRAÇÃO CELULAR DO TEMPO INICIAL E FINAL DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO.....	62

## LISTA DE SIGLAS/ABREVIATURAS

µL - microlitro

*A. baumannii* - *Acinetobacter baumannii*

BLAST - Basic Local Alignment Search Too

*C. albicans* - *Candida albicans*

CCCCryo - Culture collection of Cryophilic Algae

CHU – meio de cultivo CHU

CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono;

COI - *Cytochrome oxidase I*

DNA - ácido desoxirribonucleico

*E. cloacae* - *Enterobacter cloacae*

*E. coli* - *Escherichia coli*

*E. faecalis* - *Enterococcus faecalis*

EERE - Office of Energy Efficiency and Renewable Energy

EUA – Estados Unidos da América do Norte

FBRs – fotobiorreatores

H<sub>2</sub> – Gás hidrogênio

ITS - *Internal Transcribed Spacer*

ITS1 - *Internal Transcribed Spacer 1*

ITS2 - *Internal Transcribed Spacer 2*

KPC - *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*

ml - mililitro

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

NaCl – cloreto de sódio

NCBI - National Center for Biotechnology Information

NPDEAS - Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável

ORNL - Laboratório Nacional Oak Ridge

*P. aeruginosa* - *Pseudomonas aeruginosa*

PCR - reação em cadeia da polimerase

*rbcL* - *Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase*, *RuBisCO* - cloroplasto)

rDNA - DNA ribossômico

rpm – rotações por minuto

*S. aureus* - *Staphylococcus aureus*

*S. maltophilia* - *Stenotrophomonas maltophilia*

TAP - meio de cultura sintético TAP

TAP-S - meio de cultura sintético TAP livre de enxofre na composição

Taq - DNA polimerase termoestável

TBE - Solução tampão Tris/Borato/EDTA

T-DNA - plasmídeo de transferência

TSA - Teste de sensibilidade a antimicrobianos

TSB - Meio de cultura Tryptic Soy Broth

*tufA* - *elongation factor Tu*

UFC – Unidade formadora de colônia

US DOE - Departamento de Energia dos Estados Unidos

UV - Radiação ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1. CONTEXTUALIZAÇÃO E MOTIVAÇÃO.....	15
1.2. ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO.....	18
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>19</b>
2.1. MICROALGAS.....	19
2.1.1. Microalgas Verdes.....	20
2.1.2. Identificação de microalgas por Sequenciamento de DNA.....	20
2.2. ENGENHARIA GENÉTICA.....	21
2.3. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	22
2.4. PATÓGENOS CLÍNICOS.....	23
2.5. AÇÃO LARVICIDA.....	25
2.6. BIOCOMBUSTÍVEIS PRODUZIDOS POR MICROALGAS.....	26
2.6.1. Hidrogênio.....	27
2.7. BIORREFINARIA.....	29
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
3.1. OBJETIVOS GERAIS.....	32
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>33</b>
4.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA LINHAGEM DE MICROALGA.....	33
4.1.1. Identificação Morfológica.....	34
4.1.2. Identificação Molecular.....	35
4.1.2.1. <i>Purificação do DNA Genômico</i> .....	35
4.1.2.2. <i>Amplificação e Sequenciamento</i> .....	36
4.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS.....	37
4.2.1. Obtenção de Extratos Metabólicos.....	38
4.2.2. Atividade Antibacteriana contra Patógenos Clínicos – Teste de difusão em disco.....	39
4.2.3. Avaliação da Atividade Larvicida dos Extratos.....	40
4.3. PRODUÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE HIDROGÊNIO.....	41
4.3.1. Produção de Hidrogênio.....	41
4.3.2. Quantificação do Hidrogênio.....	42

<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
5.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MICROALGAS.....	44
5.1.1. Análise Morfológica.....	44
5.1.2. Purificação e Identificação.....	45
5.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS.....	48
5.2.1. Produção de Extratos.....	48
5.2.2. Atividade Antibacteriana contra Patógenos Clínicos – Teste de difusão em disco.....	49
5.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DOS EXTRATOS.....	60
5.4. PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO.....	62
5.4.1. Quantificação de Hidrogênio.....	62
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>64</b>
6.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MICROALGAS.....	64
6.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS.....	65
6.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DOS EXTRATOS.....	68
6.4 PRODUÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE HIDROGÊNIO.....	69
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>71</b>
7.1. CONCLUSÕES.....	71
7.2. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	72
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>73</b>



## 1. INTRODUÇÃO

Hidrogênio é considerada uma energia limpa pois o produto final da reação de combustão é a água (LIU *et al.*, 2013). A produção de hidrogênio através de métodos biológicos é considerada ecologicamente correta e sustentável devido principalmente quando comparado aos métodos convencionais (físico-químicos) de obtenção (LIU *et al.*, 2013). Por sua vez, o termo biorefinaria é utilizado para descrever a produção de biocombustíveis assim como produtos de alto valor agregado a partir do cultivo de biomassa de microalgas através da integração de bioprocessos e tecnologias de baixo impacto ambiental, com um baixo custo (HWANG *et al.*, 2014). Microalgas podem ser considerados microrganismos promissores por produzirem substâncias biologicamente ativas e compostos que podem ser utilizados na nutrição humana, por exemplo (MAYER & HAMANN, 2004). Microalgas são microrganismos muito diversificados, são também geralmente fototróficos (utilizam luz como fonte de energia e convertem em energia química) e além disso apresentam potencial de descoberta de novas aplicações e produtos. Essas características podem atribuir significativas vantagens técnicas e comerciais para a exploração industrial das microalgas.

Desta forma, fornecem um grande potencial inexplorado de novos produtos e aplicações (SUGANYA *et al.*, 2016).

### 1.1. CONTEXTUALIZAÇÃO E MOTIVAÇÃO

A utilização de microalgas apresenta um contexto bastante antigo, principalmente como insumo alimentício, porém o interesse na utilização deste microrganismo como possível fonte de biocombustível teve um considerável incremento a partir dos anos 1970 (SUGANYA *et al.*, 2016). Com relação a composição da biomassa de microalgas, esta apresenta grande variação as quais ocorrem de acordo com a espécie em questão (AMARO *et al.*, 2011). Via de regra microalgas são organismos capazes de exibir altos índices de acúmulo de proteínas e lipídeos, com cerca de 50% do peso seco de células

isento de cinzas (RÖSCH; POSTEN, 2012). Com relação a produtividade, estimativas apontam índice de cerca de 24.000 a 137.000 litros de cultivo por hectares, por ano, dependendo da espécie cultivada assim como das condições do cultivo utilizadas (RÖSCH; POSTEN, 2012). Desta forma, dentre as vantagens apresentadas pela a utilização de microalgas, em relação a outras espécies vegetais, para a produção de biocombustíveis, são destaques em algumas espécies (RÖSCH; POSTEN, 2012):

- Alta eficiência em foto conversão, com crescimento rápido e estável;
- Alto teor de lipídios e coprodutos valiosos;
- Elevada capacidade de absorção de CO<sub>2</sub> e baixas necessidades específicas de nutrientes;
- Boa robustez de tensões de cisalhamento em fotobiorreatores e competitividade contra linhagens nativas silvestres em tanques abertos;
- Tolerância às variações de temperatura resultantes do ciclo diurno e estações climáticas em geral;
- Capacidade de extração de metabólitos secundários, sem a necessidade de interromper o cultivo;
- Capacidade de auto floculação.

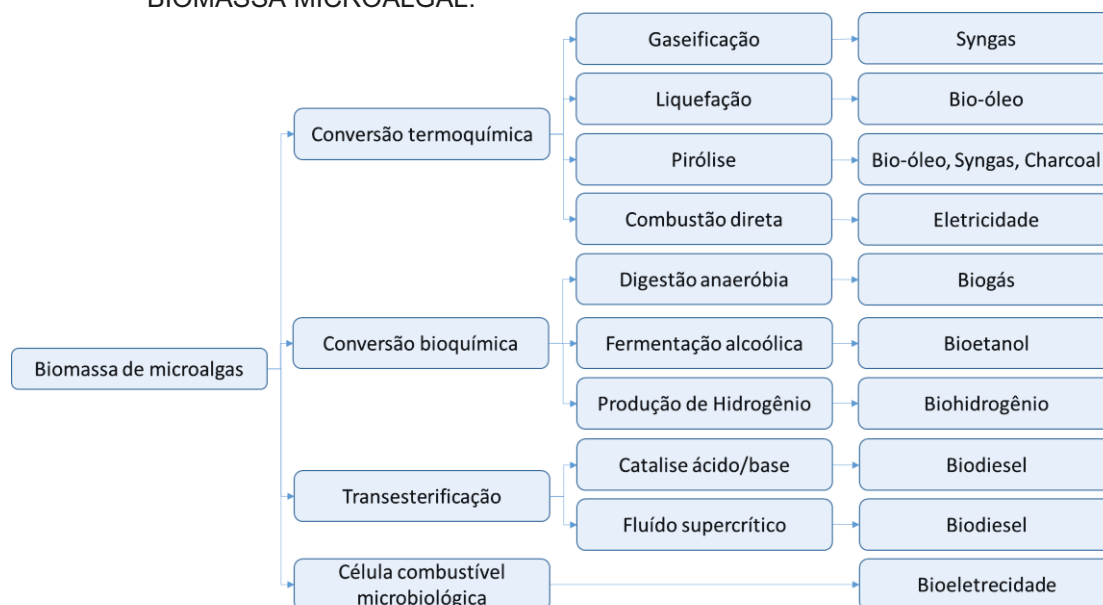
A utilização de microalgas como fonte produtora de biocombustíveis ocorre desde de meados da década de 50, quando o conceito foi aplicado para a produção de metanol (WELDY; HUESEMAN, 2007). Entretanto, o número de pesquisas nesta área foi intensificado realmente na década de 70, quando o Departamento de Energia dos Estados Unidos (US DOE), mostrou interesse, devido à crise energética (WELDY; HUESEMAN, 2007). Mas devido aos custos elevados para a produção da mesma, estudos na área de biocombustíveis a partir de microalgas, só foram retomados anos mais tarde (PRABANDONO; AMIN, 2015. p146).

O interesse pelo cultivo de microalgas objetivando a obtenção de biocombustíveis, se deve principalmente pela elevada dependência de determinadas matrizes energéticas e a crescente preocupação com questões ambientais como aquecimento global e as alterações climáticas do planeta. Assim sendo, características que permitem uma produção média de biodiesel, por exemplo, na ordem de 100 a 200 vezes superior aos índices obtidos com

sementes de plantas oleaginosa, que podem ser empregadas na alimentação de animais e humanos, surgem com alto interesse (LIANG *et al.*, 2015).

Apesar das vantagens que o cultivo de microalgas apresenta, para que este apresente competitividade no mercado, processos devem ser estabelecidos visando a máxima produção possível, e explorando o maior número possível de derivados provenientes do cultivo de microalgas (KOKOSSIS *et al.*, 2015). Em comparação com os custos de produção dos combustíveis fósseis, provenientes do petróleo, a obtenção de biocombustíveis de microalgas ainda não é competitiva (FLYNN *et al.*, 2012). Assim sendo, estratégias de melhoramento genético poderiam elevar o aumento de produtividade, seja pelo aumento das taxas de produção ou por meio da facilitação dos processos de *downstream*. A FIGURA 1 mostra exemplos das possibilidades existentes de biocombustíveis que podem ser extraídos a partir do cultivo de microalgas.

FIGURA 1 - AS POSSIBILIDADES EXISTENTES PARA SE OBTER ENERGIA A PARTIR DE BIOMASSA MICROALGAL.



FONTE: Adaptado de (CHEW *et al.*, 2017).

Nota: Syngas (gás de síntese), é uma mistura de gases combustíveis, constituído por hidrogênio, monóxido de carbono e dióxido de carbono. A nomenclatura é derivada devido ao processo de criação do gás natural sintético (SNG). Charcoal é a cinza residual produzida pela remoção de humidade e outros voláteis, em geral através do processo de pirólise lenta.

## 1.2. ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

A dissertação está organizada a partir da contextualização e motivações descritas neste item 1. No item 2 é apresentada a revisão bibliográfica. No item 3 são apresentados o objetivo geral e os objetivos específicos do trabalho. O item 4 apresenta as metodologias desenvolvidas e aplicadas para que os objetivos fossem atingidos. O item número 5, por sua vez, apresenta os resultados obtidos a partir das aplicações das metodologias desenvolvidas, resultados que são discutidos no item 6 desta dissertação. Por fim, o item 7 apresenta as considerações finais, com as conclusões e recomendações para trabalhos futuros.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. MICROALGAS

Microalgas podem ser classificadas como um grande grupo de microrganismos com alto grau de diversidade biológica, composto por organismos procarióticos (cianobactérias) e por protistas fotoautotróficos eucarióticos (SKJÅNES *et al.*, 2013). No entanto, divergências ainda prevalecem na classificação taxonômica de algas (HEGEWALD *et al.*, 2013). Assim sendo, são classificadas em grandes grupos, com base na composição de pigmentos, perfil de armazenamento de produtos e diversidade de características estruturais (LEWIS; MCCOURT, 2004). Recentemente, famílias de vários grupos de algas e suas relações com outros grupos taxonômicos estão sendo revistos, utilizando várias técnicas de biologia molecular (HEGEWALD *et al.*, 2013). Enquanto os métodos moleculares de análise filogenética são inovadores e controversos, as informações disponíveis até o momento indicam que as algas também são heterogêneas em nível molecular (SINGH; SAXENA, 2015).

Estes microrganismos são responsáveis basicamente pela metade da atividade fotossintética do planeta e são encontrados nos mais diversos ambientes (LI *et al.*, 2015). Microalgas podem ser cultivadas utilizando a energia solar e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) como fonte de carbono em lagoas rasas ou lagoas tipo *raceway*, em terra marginal ou sistemas fechados, como em fotobiorreatores (FBRs), por exemplo o modelo desenvolvido no NPDEAS, os quais utilizam tubos plásticos transparentes para o cultivo de microalgas (TRENTACOSTE *et al.*, 2015). O sistema de cultivo fechado para microalgas pode atingir até sete vezes a eficiência de produção quando comparada com sistemas de lagoas abertas (SINGH; GU, 2010. TRENTACOSTE *et al.*, 2015. HONG *et al.*, 2015).

### 2.1.1. Microalgas Verdes

Um dos maiores grupos de algas é o grupo de algas verdes que descrevem uma estrutura vegetativo, com uma enorme variedade de níveis de organização, de seres flagelados ou aflagelados, unicelulares que compõe grupos morfológicos complexos (EBENEZER *et al.*, 2012).

Microalgas verdes são divididas em dois subgrupos, *Chlorophyta* e *Charophyta*, onde os termos podem apresentar divisões diferentes, necessitando cuidado ao interpretar o significado subentendido por determinado autor (KRIENITZ; BOCK, 2012). Em geral o filo *Charophyta* contém sete classes, enquanto o filo *Chlorophyta* contém três diferentes classes (KRIENITZ; BOCK, 2012).

### 2.1.2. Identificação de microalgas por sequenciamento de DNA

Para identificar as diversas espécies de microrganismos são, tradicionalmente, utilizados testes morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e simbióticos. No entanto, particularmente nas últimas duas décadas, a biologia molecular vem ganhando espaço nos estudos de taxonomia (LARKUM *et al.*, 2012).

A identificação de espécies por sequenciamento, de DNA é considerada a metodologia mais segura para uma correta identificação, já que em muitas espécies características morfológicas são difíceis de observar e outras apresentam grande plasticidade morfológica (CHEN *et al.*, 2010). Entretanto para a correta classificação é importante escolher uma região informativa do DNA e também representativa para o grupo taxonômico em questão. Para tanto inúmeras abordagens podem ser realizadas, desde seleção de regiões do DNA e genes que apresentam maior variabilidade como COI (*Cytochrome oxidase I*) e ITS1 e 2 (*Internal Transcribed Spacer*) do rDNA. Regiões do DNA e genes com moderada variação como *rbcL* (*Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase*, *RuBisCO* - *cloroplasto*) e *tufA* (*elongation factor Tu*). Até regiões consideradas altamente conservadas como

18S rDNA e UPA (*Universal Plastid Amplicon*), a qual é a porção da subunidade grande (23S) do DNA ribossomal do cloroplasto. Porém até o momento nenhum estudo elegeu tais regiões como ideais para identificação molecular de diferentes grupos de microalgas, devido a problemas de distinção entre espécies próximas (HALL *et al.*, 2010. CHEN *et al.*, 2010. AN *et al.*, 1999. TIMMINS *et al.*, 2009. HEGEWALD *et al.*, 2003, 2013. FERRIGO *et al.*, 2014).

Desta forma os maiores avanços na utilização de técnicas de biologia molecular estão sendo obtidos pela comparação das sequências mais informativas para cada táxon, geralmente selecionadas em projetos de *barcoding* (IRINYI *et al.*, 2015). Para fungos, por exemplo, a região do DNA mais utilizada é a que codifica o ribossomo e suas respectivas sequências espaçadoras (rDNA e ITS – *Internal Transcribed Spacer*) (TIMMINS *et al.*, 2009;). A região codificante 18S é considerada conservada entre eucariotos e as regiões ITS (1 e 2) por não serem codificantes, são altamente variáveis (HALL *et al.*, 2010). Devido à sua origem polifilética (termo que designa um conjunto de espécies que apresentam caracteres comuns, mas que agrupam clados de origens variadas e, deste modo, decorrem de uma noção científica invalidada pela análise filogenética), ainda não foi encontrada uma sequência de DNA capaz de resolver questões taxonômicas de todos os grupos de microalgas (AN *et al.*, 1999. HEGEWALD *et al.*, 2003).

## 2.2. ENGENHARIA GENÉTICA

A engenharia genética consiste em processos de manipulação do material genético de um organismo, por meio de determinadas técnicas que, em geral, alteram a expressão de genes deste organismo e podem inclusive levar à combinação de elementos genéticos de dois genomas diferentes para formar um novo genótipo (MURPHY, 2006). Assim sendo, é importante estabelecer a diferença da engenharia genética da engenharia bioquímica, que consiste na melhoria das taxas de produção através da regulação e manejo das vias metabólicas de determinado produto (LI *et al.*, 2008). Desta forma a necessidade de superar as limitações apresentadas pela engenharia bioquímica, com relação ao favorecimento de determinada via metabólica, é

um grande incentivo às pesquisas que utilizam a engenharia genética, para que linhagens melhoradas de microalgas sejam produzidas, objetivando uma maior produtividade (GUARNIERI *et al.*, 2011).

Para tanto a engenharia genética pode ser utilizada aliada aos conhecimentos já adquiridos de engenharia bioquímica, microbiologia e áreas correlatas à indústria, visando um produto final com maior qualidade e rendimento.

### 2.3. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Metabólitos são definidos como compostos orgânicos envolvidos no metabolismo de células vivas (NETZKER *et al.*, 2015). Alguns destes não realizam função nos processos metabólicos de crescimento, reprodução ou manutenção celular, denominados primários, mas são produzidos para utilização em funções celulares secundários (BRAKHAGE, 2013). Estes denominados metabólitos secundários, são muitas vezes produzidos como uma resposta ao stress ambiental. A função pode ser associada ao aumento da taxa de sobrevivência ou manutenção da taxa de crescimento sob condições específicas.

Microalgas verdes são conhecidas por apresentarem quantidades elevadas de nutrientes (proteínas, lipídeos, entre outros). Sob condições ideais de crescimento o conteúdo destes nutrientes apresenta relativamente baixa variação entre espécies (HU, 2004). Quando submetidas em condições de cultivo não favoráveis ao crescimento, o perfil de expressão dos metabólitos é modificado, com o objetivo de adaptar as condições de cultivo ao desenvolvimento. Este perfil de expressão é, porém, dependente do tipo de condição exposto ao desenvolvimento (NETZKER *et al.*, 2015).

O interesse na busca por novos agentes antimicrobianos deve-se principalmente pelo rápido surgimento de resistência a estes agentes. A bioprospecção desses agentes, ao longo dos tempos, mostra que suas descobertas são originadas a partir de fontes naturais, tais como microrganismos e extrato de plantas. (ADEGBOYE; BABALOLA, 2013)



## 2.4. PATÓGENOS CLÍNICOS

Patógenos são agentes biológicos conhecidos pela capacidade de causar doença em seres humanos. Nessa categoria podem ser englobados os mais diversos microrganismos desde bactérias até fungos, protozoários e vírus. Para o controle destes patógenos pode-se fazer o uso de antibióticos, os quais são substâncias capazes de combater uma infecção causada por estes agentes que causam infecções a outro organismo (WANNMACHER, 2004). A grande disponibilidade de agentes antimicrobianos, e o uso indiscriminado destes, resulta em uma espécie de seleção de linhagens resistentes à ação dessas substâncias, fato este que apresenta grande impacto no aumento dos custos para os tratamentos para a eliminação destes agentes biológicos em órgãos da saúde (RAGBETLI *et al.*, 2016; WHO, 2016).

Os patógenos utilizados neste projeto, foram selecionados devido à alta incidência destas linhagens em ambiente hospitalar. As linhagens são apresentadas na TABELA 1.

TABELA 1 - PATÓGENOS CLÍNICOS UTILIZADOS NO TESTE DE DIFUSÃO EM DISCO COM OS EXTRATOS PRODUZIDOS A PARTIR DO CULTIVO DE MICROALGAS.

LINHAGEM	
<i>Enterobacter cloacae</i> (Gram-negativa)	<p><i>Enterobacter cloacae</i> (<i>E. cloacae</i>) são bactérias gram-negativas, que apresentam forma de bastonetes, são anaeróbias facultativas, e não formam esporos. São patógenos oportunistas e multiressistentes, com grande incidência em ambiente hospitalar (REGLI &amp; PAGÈS, 2015).</p> <p>A disseminação do gênero desta bactéria é associada à presença de cascatas reguladoras que controlam a permeabilidade da membrana do microrganismo, garantindo assim a proteção da integridade da membrana (HAN <i>et. al.</i>, 2017). Outra causa pode ser associada a enzimas responsáveis pela degradação e/ou inativação de antibióticos (HAN <i>et. al.</i>, 2017). Além disso, estas espécies bacterianas são capazes de adquirir numerosos elementos móveis genéticos que contribuem fortemente para a resistência aos antibióticos (REGLI &amp; PAGÈS, 2015).</p>
<i>Escherichia coli</i> (Gram-negativa)	<p><i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) são as bactérias mais estudadas do gênero <i>Enterobacteriaceae</i>, são gram-negativas e anaeróbicas facultativas (VISVALINGAM <i>et. al.</i>, 2017). São microrganismo encontrados no trato intestinal de seres humanos e animais, que podem ser transmitidas através de alimentos, água e até mesmo pelo contato entre humanos (VISVALINGAM <i>et. al.</i>, 2017).</p> <p>Pesquisas mostram que o número de casos de <i>E. coli</i> que apresentam resistência a antibióticos aumenta, nos últimos anos, de forma desproporcional à descoberta de elementos com ação antibacteriana (SOUSA, 2006).</p>

CONTINUAÇÃO		
<i>Staphylococcus aureus</i> (Gram-positiva)	<i>aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ( <i>S. aureus</i> ) é uma bactéria esférica, gram-positiva, frequentemente encontrada na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis (YAN <i>et al.</i> , 2017). <i>S. aureus</i> apresenta altos índices de contaminação alimentar só nos Estados Unidos cerca de 241.000 doenças por ano são causadas por esta espécie de bactéria (POURAKBARI <i>et al.</i> , 2017). A resistência desta espécie já foi relatada com relação a penicilina, e a meticilina, as quais passaram a ser denominados <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina (MRSA) (TONG <i>et al.</i> , 2015).
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (Gram-negativo)	(Gram-negativo)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ( <i>S. maltophilia</i> ) é um bacilo gram-negativo, não fermentativo (CORLOUER <i>et al.</i> , 2017). Pode ser considerado um microrganismo patógeno oportunista, a baixa virulência intrínseca é equilibrada por sua resistência natural a uma ampla gama de antibióticos, incluindo antibióticos de amplo espectro (DEREDJIAN <i>et al.</i> , 2016).
<i>Acinetobacter baumannii</i> (Gram-negativa)		<i>Acinetobacter baumannii</i> ( <i>A. baumannii</i> ) é uma espécie de bactéria aeróbia gram-negativa, que pode ser isolada a partir de amostras ambientais, e é comumente associada a infecções oportunistas (CHEN <i>et al.</i> , 2017). É considerada a segunda linhagem de bactérias mais frequentemente isolada em humanos, apresenta elevada patogenicidade, com relatos de resistências a antibióticos (ZHAO <i>et al.</i> , 2017).
KPC ( <i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i> ) (Gram-negativa)	(Gram-negativa)	<i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i> (KPC) é uma espécie de bactéria gram-negativa, anaeróbia facultativa e resistente a uma classe de antibiótico beta-lactâmicos de amplo espectro, carbapenema ou carbapenem (YAMASAKI <i>et al.</i> , 2017). As enzimas expressas por esta bactéria têm a capacidade de hidrolisar não apenas carbapenem, mas também outras classes de antibióticos $\beta$ -lactâmicos, resultando na restrição nas opções de tratamentos do KPC (CAMPOS <i>et al.</i> , 2016).
<i>Enterococcus faecalis</i> (Gram-positiva)	<i>faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> ( <i>E. faecalis</i> ) é uma bactéria gram-positiva, anaeróbia facultativa e não formadora de esporos (HWANHLEM <i>et al.</i> , 2017). É uma bactéria facilmente encontrada em animais, seres humanos, solo, superfícies aquáticas, plantas e em alguns vegetais (VU & CARVALHO, 2011). Devido a resistência em especial aos antimicrobianos comumente utilizados (aminoglicosídeos, aztreonam, cefalosporinas, clindamicina, oxacilina), resultou na importância deste patógeno, principalmente em ambientes hospitalares (PERUMAL & VENKATESAN, 2011).
<i>Candida albicans</i> (fungo)		<i>Candida albicans</i> ( <i>C. albicans</i> ) é um fungo patogênico de maior incidência em ambiente hospitalar, é responsável por infecções de aspecto superficial e até doenças sistêmicas com risco de vida (DE VITA <i>et al.</i> , 2016). Os relatos de resistência a drogas do tipo azólicas, revela uma urgente busca de novos agentes para o tratamento de infecções causadas por este microrganismo (ZIDA <i>et al.</i> , 2017). Estes relatos são comumente associados à formação de biofilme por <i>C. albicans</i> (TONG & TANG, 2017).

CONTINUAÇÃO	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Gram-negativa)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ( <i>P. aeruginosa</i> ) é uma bactéria, considerada oportunista, gram-negativa (MURAKAMI <i>et al.</i> , 2017). Com relação a resistência ao tratamento por antibióticos o histórico desta espécie apresenta vários casos de resistência, porém os mecanismos que contribuem para tal permanecem pouco claros (BADAMCHI <i>et al.</i> , 2017). A tolerância aos antibióticos, resulta no interesse crescente nos últimos anos, a tolerância que não envolve mutação, é definida como a capacidade das bactérias em sobreviver, mas não crescer na presença de antibióticos acima da concentração mínima inibitória (MIC) para aquela espécie (CHAKOTIYA <i>et al.</i> , 2017).
MRSA ( <i>Staphylococcus aureus</i> ) (Gram-positivo)	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA) apresentam infecção e colonização estão associadas ao aumento dos índices de mortalidade resultando assim no aumento dos custos relacionados com internação hospitalar (MCMICKEN, 2016). A resistência desta linhagem estão relacionados e são determinantes a ação da enzima $\beta$ -lactamase e das proteínas de ligação à penicilina (PBP) (MIAO <i>et al.</i> , 2017).

FONTE: O Autor.

## 2.5. AÇÃO LARVICIDA

Estudos envolvendo propriedades farmacêuticas e nutracêuticas dos metabólitos secundários de microalgas vermelhas (filo *Rhodophyta*) e pardas (filo *Phaeophyceae*), são amplamente realizados (BLUNT *et al.*, 2011; CABRITA *et al.*, 2010). Tais estudos comprovam a produção de compostos com ação antibiótica comprovada, assim como produção de compostos com potencial larvicida contra *Aedes aegypti*, larva do mosquito transmissor da febre da dengue (KIM *et al.*, 2008).

A febre da dengue é um problema de saúde pública prioritária no Brasil segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (BIANCO *et al.*, 2013). A doença é causada por quatro variedades de um gênero de vírus (flavivírus), sua transmissão ocorre através do contato de seres humanos e de um mosquito infectado (NEVES-FILHO *et al.*, 2009; BIANCO *et al.*, 2013). A resistência crescente adquirida pelo mosquito aos inseticidas utilizados reforça o interesse em compostos alternativos para o controle e prevenção em países endêmicos (LIMA *et al.*, 2006; MELO-SANTOS *et al.*, 2010; BIANCO *et al.*, 2013).

## 2.6. BIOCOMBUSTÍVEIS PRODUZIDO POR MICROALGAS

Segundo o Escritório dos EUA de Eficiência Energética e Energia Renovável (EERE), biocombustíveis são definidos como qualquer biomassa convertida em combustível líquido ou gasoso, como por exemplo, etanol, metanol, metano e hidrogênio. Já o Laboratório Nacional Oak Ridge (ORNL) que é uma unidade administrada pelo Departamento de Energia dos EUA, define biocombustível como combustível feito a partir de uma biomassa ou os seus derivados e de processamento de conversão (BRENNAN; OWENDE, 2010).

A classificação ocorre de acordo com a origem da biomassa que resulta no biocombustível (BRENNAN; OWENDE, 2010).

- Primeira Geração – produzido a partir de óleos, açúcares, e amiláceos produzidos originalmente com o objetivo de alimentício;
- Segunda Geração - biocombustíveis produzidos a partir de culturas não destinadas a alimentação, como gramíneas e materiais lenhosos assim como porções não alimentares de culturas alimentares;
- Terceira Geração - os biocombustíveis produzidos a partir de algas que podem apresentar rendimentos maiores que os demonstrados por outras fontes.

Os biocombustíveis são reconhecidos como combustíveis alternativos mais adequados para os motores que foram originalmente concebidos para utilizar combustíveis fósseis. Embora o processo de formação da matéria prima, de combustíveis fósseis, seja contínuo, a atual taxa de consumo é mais elevada do que a taxa de formação. Desta forma, os combustíveis fósseis são considerados não renováveis, isto é, o balanço entre consumo e produção sugere que eles não são repostos tão rápido quanto são consumidos (ANH *et al.*, 2011). Outra problemática apresentada pela utilização dos combustíveis de origem fóssil é a reintrodução, na atmosfera, de moléculas de carbono, o que resulta no aumento da concentração de CO<sub>2</sub> na atmosfera, fato que contribui de forma significativa para o aumento das mudanças climáticas (LEITE *et al.*, 2013).

Após décadas de uso intensivo, a humanidade se tornou fortemente dependente dos combustíveis fósseis. Assim sendo, é inegável que a economia mundial depende do sistema, que se apresenta muito eficiente na questão de produção, distribuição e uso que tem sido desenvolvido. Assim sendo, qualquer transição para o uso massivo de um novo combustível terá que ser “indolor”, utilizando a tecnologia de infraestrutura e do sistema existente, tanto quanto possível (LEITE *et al.*, 2013).

Microalgas como biomassa apresentam composição química variada e espécie dependente, as quais podem apresentar altas concentrações de proteínas, lipídios ou carboidratos (SING *et al.*, 2013). O conceito de utilização de microalgas como combustível foi proposto pela primeira vez por Meier em 1955 para a produção de gás metano a partir de carboidratos oriundos de biomassa microalgal. Já a extração de lipídios de microalgas, que podem ser convertidos em biodiesel, tem sido de interesse para o Departamento de Energia dos EUA (DOE) desde a década de 70 (BRENNAN; OWENDE, 2010). O conteúdo lipídico de microalgas pode ser utilizado diretamente como combustível ou ainda ser quimicamente transesterificado em biodiesel. Outros biocombustíveis de microalgas, tais como etanol e metano são produzidos utilizando a biomassa das microalgas como substratos orgânicos e podem ser fermentados por microrganismos sob condições anaeróbias (CHOKSHI *et al.*, 2015). Já o hidrogênio, por sua vez, pode ser produzido por algas e cianobactérias fotossintéticas sob certas condições e nutrientes ou com depleção de oxigênio, e por bactérias utilizando substratos orgânicos, sob condições anaeróbicas (LEITE *et al.*, 2013).

#### 2.6.1. Hidrogênio

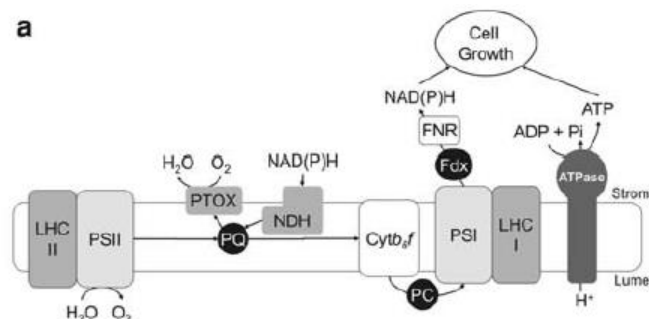
Hidrogênio é uma fonte de energia de grande interesse, devido principalmente aos produtos resultantes da utilização como combustível, já que esta aplicação resulta na ausência de emissão de carbono (PARMAR *et al.*, 2011). A produção biológica de hidrogênio ocorre por intermédio de microrganismos, os quais podem realizar fotossíntese (microalgas verdes,

cianobactérias e bactérias fotossintéticas) ou não (bactérias fermentativas) (NAGARAJAN *et al.*, 2017).

Existem alguns gêneros de microalgas que já foram relatadas como produtoras do gás hidrogênio (*Botryococcus*, *Chlamydomonas*, *Chlorococcum*, *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Synechocystis*, *Tetraspora*, *Anabaena*, *Nostoc*) (EROGLU & MELIS, 2016). Linhagens pertencentes a estes gêneros possuem maquinaria fotossintéticas necessárias para a produção de hidrogênio utilizando água como fonte de elétrons e luz solar como fonte de energia (HE *et al.*, 2017). As microalgas verdes são microrganismos fotossintéticos que possuem moléculas de pigmento capazes de absorver a energia solar e convertê-la em energia química pela separação simultânea de água em oxigênio molecular ( $O_2$ ) e prótons ( $H^+$ ) (SINGH *et al.*, 2015). A produção de hidrogênio, a partir de microalgas consiste em uma série de reações redox que iniciam com a quebra da molécula de água e a transferência de elétrons do fotossistema II (PSII) resultando na produção de gás hidrogênio, sendo necessário condições de luminosidade (MELIS *et al.*, 2000. MELIS; HAPPE, 2001).

A luminosidade é responsável pela ativação de enzimas que iniciam o processo de produção do hidrogênio (TSYGANKOV *et al.*, 2002). A hidrogenase é ativada e os íons ( $H^+$ ) produzidos em etapa anterior são reduzidos a gás hidrogênio pela ação reversível da hidrogenase (KOSOUROV *et al.*, 2007), e como mostra o esquema da via apresentado na FIGURA 2.

FIGURA 2 - ESQUEMA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS EM CÉLULA DE MICROALGA VERDE DURANTE A FOTOSSÍNTESE.



FONTE: HEMSCHMEIER *et al.*, 2009

Um dos principais fatores limitantes para a produção de hidrogênio por microalgas está relacionado a sensibilidade das enzimas responsáveis pela

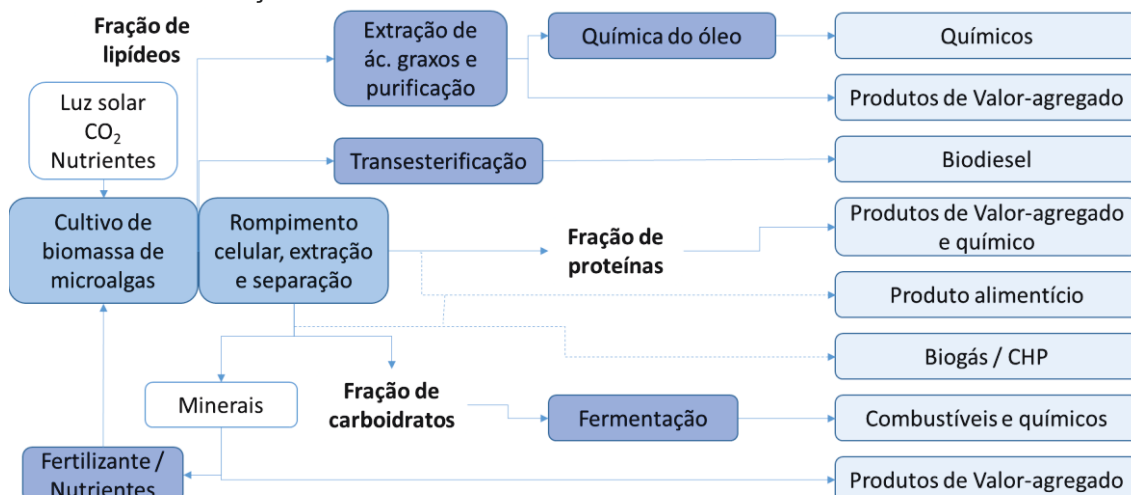
produção do gás hidrogênio ao oxigênio (GHIRARDI, 2015). Microalgas verdes por serem microrganismos fotosintéticos oxigenados, produzem oxigênio devido à divisão de água em PSII, o que pode inibir as atividades de hidrogenase (enzima responsável pela produção de hidrogênio) (LAMBERTZ *et al.*, 2011). Em condições normais de crescimento, a taxa fotossintética é cerca de 4 a 7 vezes maior do que a taxa de respiração, enquanto que em condições de cultivo que limitam a presença de enxofre no meio, a taxa de fotossíntese é induzida até a taxa de respiração em condições anaeróbicas, condição adequada para a produção de hidrogênio (GHIRARDI, 2015).

Com relação a escala de produção de hidrogênio, o processo que apresenta melhores índices energéticos e econômicos de viabilidade é a produção a partir de hidrocarbonetos de origem fóssil, através do uso de vapor superaquecido, quando comparado com metodologia como eletrólise da água e a termólise e fotólise direta da água, sem o uso de combustível fóssil, metodologias que não apresentam balanço energético favorável. Desta forma, o potencial de produção de hidrogênio através do cultivo de microalgas em fotobiorreatores se apresenta como um processo bastante promissor (VARGAS *et al.*, 2014).

## 2.7. BIORREFINARIA

Biorrefinaria consiste na conversão de biomassa em uma variedade de produtos químicos, biomateriais e energia, visando a máxima valorização da biomassa, e o mínimo desperdício (CHEW *et al.*, 2017). Conceito este análogo ao originado em refinarias de petróleo, que incluem mínimo custo de produção, alto volume de produção, produção de compostos químicos e materiais base de outros processos, assim como produtos de alto valor agregado e baixo volume de produção (GÜNERKEN *et al.*, 2015). A FIGURA 3 apresenta a exemplificação de um processo genérico de microalgas no conceito de biorrefinaria.

FIGURA 3 - APLICAÇÕES DE MICROALGAS NO CONCEITO DE BIOREFINARIA.



FONTE: Adaptado de (CHEW *et al.*, 2017).

Apesar das vantagens apresentadas como características de cultivo das microalgas algumas limitações existem. Um dos principais obstáculos é a viabilidade econômica da produção em larga escala, devido ao balanço energético do processo, assim como do processamento das etapas de *downstream*. A possibilidade de coprodutos, metabólitos, que podem ser derivados do cultivo de microalgas, mostra o potencial de emprego, destes microrganismos em grandes escalas (GERARDO *et al.*, 2015).

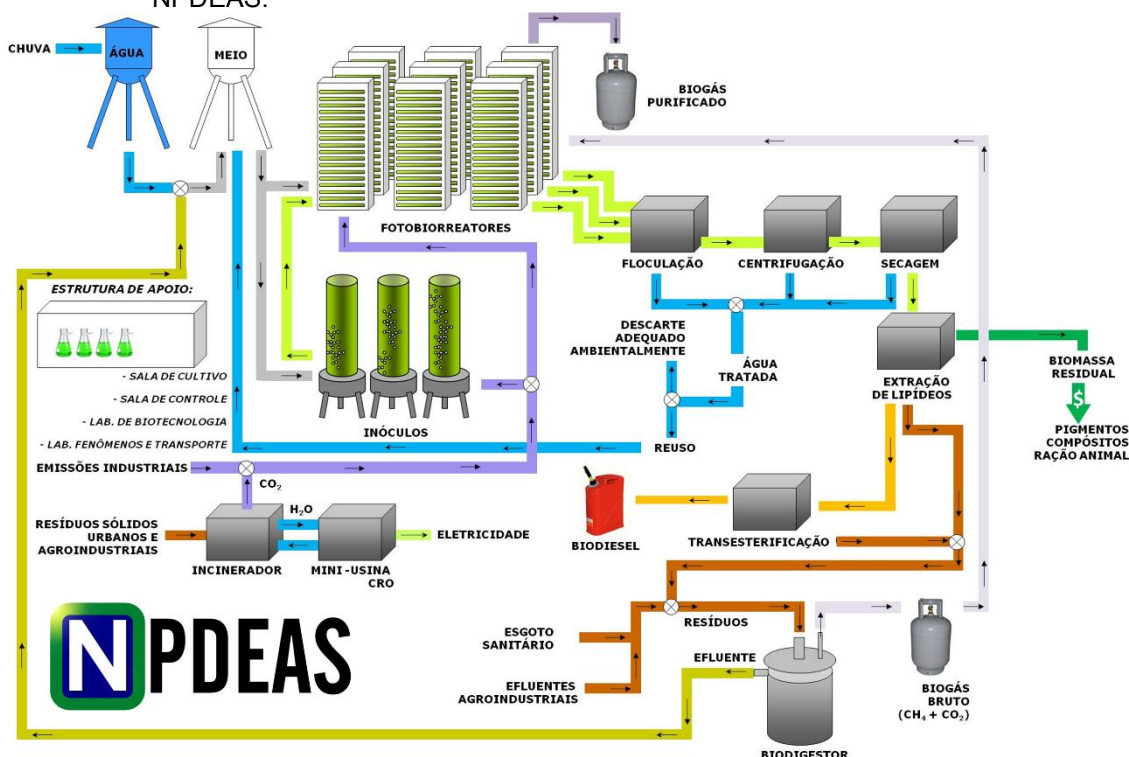
Metabólitos são, por definição, qualquer composto orgânico envolvido nos metabolismos de células vivas. Metabólitos podem ser classificados em primários e secundários, onde os primários são envolvidos na manutenção da vida celular, crescimento e reprodução, e os secundários são produzidos quando as células são submetidas, em crescimento, a condições não ideais, com o objetivo de superar tais condições de cultivo (SKJANES *et al.*, 2013). Tais metabólitos em teoria são produzidos por todas as espécies de microalgas, porém o conhecimento prático destes ainda é pequeno, apesar do potencial que estes apresentam para a indústria farmacêutica, por exemplo (BOROWITZKA, 2013).



### 3. OBJETIVOS

A revisão bibliográfica apresentou o potencial para o emprego de microalgas na produção de biocombustíveis e coprodutos. Apesar das vantagens apresentadas pelo cultivo de microalgas, as limitações atuais, ainda impedem que um projeto em larga escala seja econômica e energeticamente viável. Desta forma, o desenvolvimento de estratégias com o objetivo de melhorar o rendimento na produção mostra-se necessário. Dentre estas, o melhoramento de linhagens utilizando ferramentas da engenharia genética apresenta-se como uma possibilidade para superar tais limitações, auxiliando no incremento da viabilidade econômica de um projeto em larga escala, como o desenvolvido no NPDEAS. A FIGURA 4 apresenta o fluxograma do processo estabelecido.

FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS PROCESSOS DESENVOLVIDOS NO NPDEAS.



Fonte: NPDEAS.

Dentro do fluxograma de qualquer processo de produção existem etapas que devem ser aprimoradas para que o balanço de energia seja

favorável. Etapas como a separação da biomassa do meio de cultivo, a extração do óleo e a obtenção de coprodutos podem ser aprimoradas através do melhoramento de determinadas características de uma espécie de microalga.

### 3.1. OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho tem por objetivo principal identificar e avaliar a capacidade de produção de hidrogênio e de coprodutos pela linhagem de microalga utilizada nos FBRs do NPDEAS visando contribuir para a viabilidade econômica da produção em larga escala da biomassa microalgal para biocombustível, através do conceito de biorrefinaria.

### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar a principal linhagem de microalga utilizada nos FBRs do NPDEAS;
- Avaliar a atividade biológica de extratos produzidos pela linhagem isolada, e
- Desenvolver processo de produção e quantificação de hidrogênio produzido pela linhagem isolada.

#### 4. METODOLOGIA

As metodologias aplicadas durante toda a realização dos experimentos, são apresentadas segundo cada etapa proposta para o desenvolvimento desta dissertação.

##### 4.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA LINHAGEM DE MICROALGA

A obtenção de linhagens de microalga únicas ocorreu através da técnica de diluição seriada, com o objetivo de dissociar possíveis microrganismos presentes na amostra e selecionar colônias isoladas de possíveis espécies de microalgas (ZHANG *et al.*, 2014).

O isolamento ocorreu através da diluição de uma alíquota da amostra, mantida em meio CHU (TABELA 2), em solução salina (NaCl 0,8% p/v), seguindo com diluições sequenciais em concentrações determinadas ( $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ). Destas soluções resultantes uma alíquota (20.0  $\mu$ L) foi transferida para placas de petri contendo meio CHU sólido (concentração de ágar 10g/L), as quais foram encaminhadas para cultivo pelo período de 7 a 10 dias em condição controladas de luz, temperatura, umidade e concentração de dióxido de carbono respectivamente (125  $\mu$ mol, 22 °C, 36% e 356 PPM).

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO CHU.

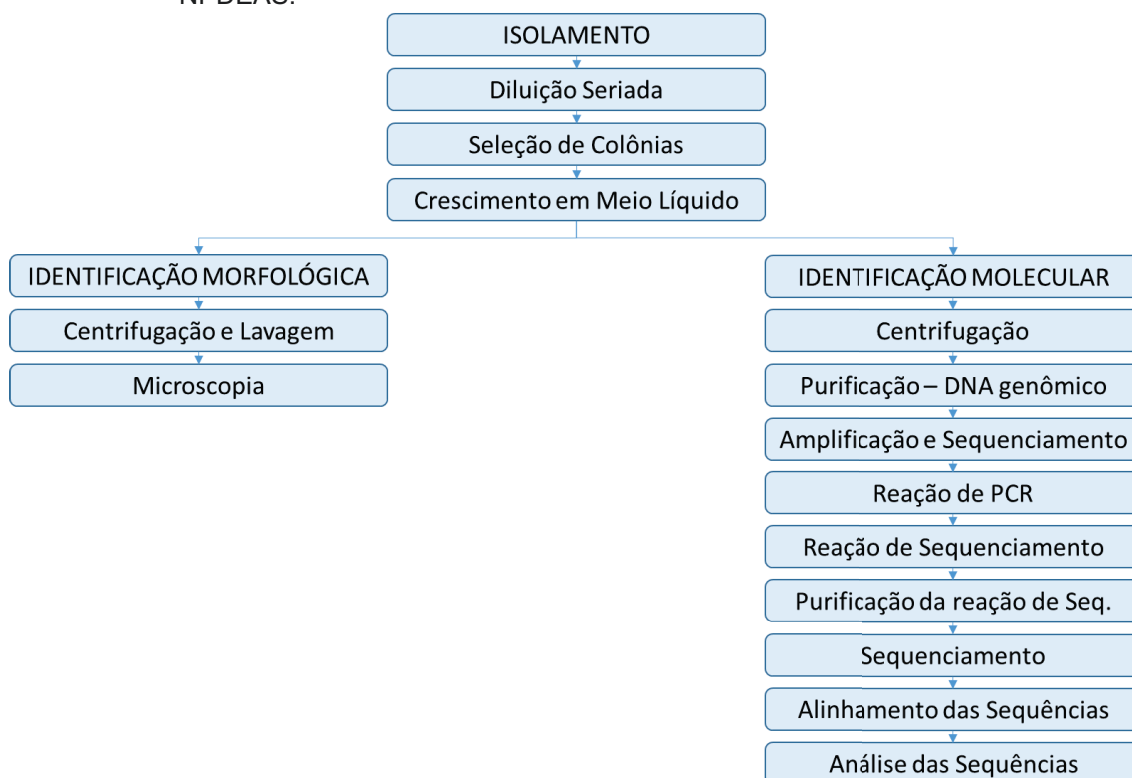
Componentes	Concentração em Solução Estoque (g·L <sup>-1</sup> )	Volume para 1.000 ml de meio (L)
NaNO <sub>3</sub>	25,0	0,01
CaCl <sub>3</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2,50	0,01
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	7,50	0,01
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,50	0,01
MgH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17,5	0,01
NaCl	2,50	0,01
C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> ·2H <sub>2</sub> O	5,00	0,001
KOH	31,0	0,001
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4,90	0,001
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11,4	0,001
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,00882	0,001
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,00144	0,001
MoO <sub>3</sub>	0,00071	0,001
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,00157	0,001
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,00049	0,001

FONTE: Adaptado de CHU, 1942.

Após o período de incubação, colônias foram selecionadas devido a diferenças morfológicas, com relação a intensidade da coloração e aos bordos (diferentes morfotipos), apresentando assim a possibilidade destas diferenças resultarem em diferentes táxons presentes na amostra disponibilizada.

As colônias selecionadas foram transferidas para cultivo líquido, com auxílio de uma alça de platina, e mantidas nas mesmas condições de cultivo aplicadas na etapa anterior. A metodologia completa para identificação da linhagem é representada na FIGURA 5.

FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA METODOLOGIA APLICADA PARA A IDENTIFICAÇÃO DA LINHAGEM DE MICROALGA UTILIZADA NOS FBR'S DO NPDEAS.



FONTE: O Autor.

#### 4.1.1. Identificação Morfológica

A produção de lâminas para identificação morfológica, ocorreu inicialmente com a coleta de uma alíquota das amostras isoladas, com tempos de cultivo superiores a 14 dias, objetivando alta concentração de células. As

amostras foram submetidas a centrifugação (5 minutos em 12.000 rpm), e o sobrenadante foi descartado.

Na sequência uma alíquota de solução salina (NaCl 0,8% p/v), com o dobro de volume, da alíquota de cada inóculo, foi utilizada para ressuspender o precipitado formado, objetivando a lavagem das células obtidas, a etapa de centrifugação foi repetida duas vezes.

Ao final, o precipitado obtido foi ressuspendido em um volume de solução salina equivalente a um quarto ( $\frac{1}{4}$ ) do volume do inóculo submetido no início da metodologia. As lâminas foram montadas com a transferência de um volume de 10  $\mu$ L da solução final, seguida pela deposição de lamínula sobre o volume transferido e a selagem do conjunto.

As lâminas foram encaminhadas para a obtenção das imagens em microscópio Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Jena, DE), equipado com software Metafer 4 de captura automatizada (Metasystems, Altlussheim, DE). Utilizando câmara de modelo: CoolCube Monocromática 1 - Metasystems.

#### 4.1.2. Identificação Molecular

As linhagens obtidas na etapa de purificação foram cultivadas em meio líquido (TAP) para crescimento da biomassa microalgal. O escalonamento do cultivo até a obtenção de biomassa para submeter a purificação do DNA genômico iniciou com volume de 2,0 mL de cultivo, seguindo para 20,0 mL e finalizado com volume de 200,0 mL. Após o período de 7 dias de cultivo do volume final de 200,0 mL, o crescimento foi interrompido e ocorreu a recuperação da biomassa através de centrifugação (4.000 rpm, 15 min.).

A biomassa recuperada foi então encaminhada para liofilização, e posterior extração do DNA genômico, através de utilização de kit de purificação comercial (NucleoSpin Plant II da Macherey-Nagel, MN, Düren, Germany).

##### 4.1.2.1. *Purificação do DNA Genômico*

O DNA genômico das linhagens selecionadas foram purificados com o kit NucleoSpin Plant II da Macherey-Nagel (MN, Düren, Germany), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação, integridade e a avaliação da

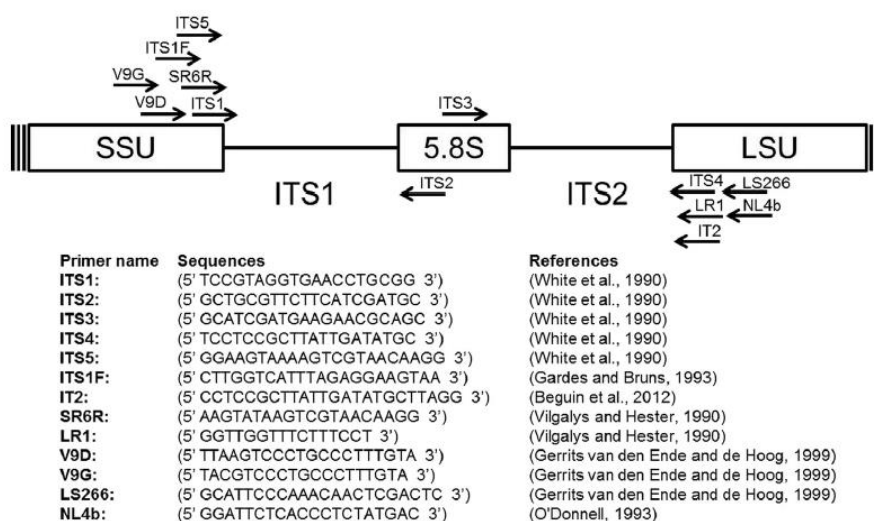
pureza do DNA obtido foi realizada em Nanodrop e confirmada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%.

A partir dos resultados obtidos pela quantificação do DNA genômico obtido, as diluições necessárias para a utilização dos DNAs em reação de PCR serão realizadas.

#### 4.1.2.2. Amplificação e Sequenciamento

A amplificação da região ITS do DNA ribossomal foi realizada através da utilização dos oligonucleotídeos LS266 (5'-gCATTCCCAAACAACCTCGACTC-3') e V9G (5'-TTACgTCCCTgCCCTTTgTA-3') (GERRITS VAN DEN ENDE; DE HOOG, 1999), onde a região de amplificação está representada esquematicamente na FIGURA 6. A reação de PCR utilizou, volume final de 12.5 µl contendo 1.0 µl de DNA da amostra (10.0 ng), 0.25 µl de cada primer para a PCR (10.0 mM), dNTPs Mix 6.0 µl (0,3 U/reação), 0.375 µl MgCl<sub>2</sub> (50.0 mM), 1.0 U Taq DNA e 4.625 µl água MilliQ autoclavada. As condições da reação foram, desnaturação inicial 94 °C por 2 minuto, seguido por 30 ciclos de desnaturação em 94 °C por 30 segundos, anelamento a 56 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 60 segundos. Uma extensão final ocorreu na temperatura de 72 °C por 10 minutos.

FIGURA 6 - ESQUEMA DA ESTRUTURA DA REGIÃO ITS, INDICANDO OS PRIMERS QUE SÃO MAIS COMUMENTE UTILIZADOS EM DIAGNÓSTICOS DE HUMANOS E FUNGOS.



FONTE: IRINYI *et. al.*, 2015 (DNA barcoding of fungi causing infections in humans and animals)

O produto da reação foi submetido à corrida em gel de eletroforese de 1,5% de agarose em TBE 1x, e utilizando o GelRed® (Life Technologies, USA) para permitir a visualização do DNA em luz UV.

A reação de sequenciamento foi realizada com os mesmos oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR (V9G e LS266). O produto da reação de sequenciamento foi purificado utilizando as enzimas Exo1 e FastAP™ (GE Healthcare, USA), e diretamente sequenciado utilizando Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit e verificado em sequenciador automático modelo ABI Prism 3500 (Applied Biosystems).

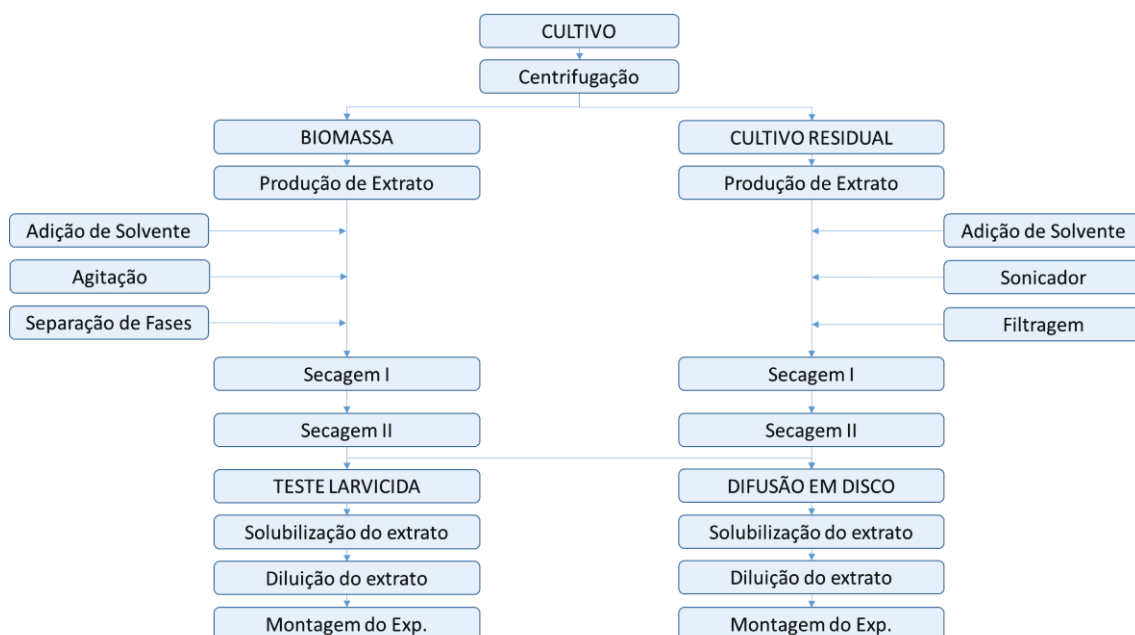
As sequências foram visualmente verificadas e alinhadas nos programas BioEdit e Mega 6.0, e comparadas com sequências depositadas no banco de dados do NCBI através da ferramenta BLAST.

#### 4.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATO

Os coprodutos identificados correspondem a produtos com potencial antimicrobiano. Este potencial foi investigado com relação à espécie de microalga utilizado nos fotobiorreatores do NPDEAS. A metodologia consistiu na obtenção de extratos metabólicos os quais foram utilizados em teste de sensibilidade a antimicrobianos (TSA), conforme descrito por Savi e colaboradores 2015 (SAVI *et al.*, 2015), e em teste para investigação de ação larvícida (MANILAL *et al.*, 2011. BIANCO *et al.*, 2013).

A metodologia de produção de extratos a partir das fases de cultivo de biomassa microalgal e avaliação da atividade biológica, seguiram os processos descritos nos itens 4.3.1, 4.3.2 e 4.3.3. Onde os passos são apresentados no fluxograma da FIGURA 7.

FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA METODOLOGIA APLICADA PARA A PRODUÇÃO DE EXTRATOS E INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA.



FONTE: O Autor.

#### 4.2.1. Obtenção de Extratos Metabólicos

Os extratos produzidos e utilizados nos testes de sensibilidade a antimicrobianos foram obtidos através da utilização de dois solventes orgânicos (acetato de etila e diclorometano), aplicados em conjunto ao cultivo residual e biomassa gerados com três meios de cultivos. Meio de cultivo alternativo, meio de cultivo CHU e meio de cultivo TAP. Objetivando investigar a existência de metabólitos secundários, respectivamente, presentes no meio de cultivo residual e na biomassa formada.

Para tanto a produção de extratos a partir da biomassa formada foi realizada com diclorometano. O procedimento consistiu na recuperação da biomassa por meio de centrifugação (14.000 rpm, 10 minutos e 20 °C). Na sequência o mesmo volume de cultivo utilizado na recuperação da biomassa, foi adicionado (1:1). Este sistema foi então submetido ao sonicador (Marca: Unique, modelo: USC-1400, frequência: 40khz), pelo período de 1 hora. Após o período o sistema foi submetido a filtração com papel filtro qualitativo Whatman de graduação 4.



A produção de extratos a partir do meio de cultivo residual foi realizada com acetado de etila. O procedimento consistiu na adição de volume igual (1:1), de solvente orgânico ao cultivo residual, proveniente da etapa de centrifugação. Na sequência, com o auxílio de um funil de decantação foi realizado, a separação entre a fase polar e o extrato resultante. Este procedimento foi realizado pelo menos duas vezes.

Os extratos obtidos foram então submetidos a rotaevaporação (150 rpm a 45 °C) e evaporação em estufa a 37 °C, posteriormente foram pesados e diluídos a uma concentração de 10 mg/mL.

#### 4.2.2. Atividade Antibacteriana contra Patógenos Clínicos – Teste de difusão em disco

A atividade dos extratos produzidos foi avaliada através do teste de difusão em disco. A metodologia consiste no cultivo dos patógenos utilizados em meio líquido TSB, volume de 5,0 mL de meio, em temperatura de 37 °C, e agitação de 180 rpm pelo período de 10 horas. Na sequência ocorre a diluição destes cultivos até a concentração de  $10^8$  UFC/mL com base na escala MacFaland N° 0.5. Em seguida placas de petri com meio ágar Mueller-Hinton, foram inoculadas com as respectivas diluições, e discos de papel filtro impregnados com os extratos foram depositados sobre o meio. O conjunto montado foi encaminhado para estufa a 37 °C pelo período de 24 horas.

Como controle positivo foram utilizados antibióticos com ação comprovada contra as linhagens testadas, e como controle também foi utilizado o solvente aplicado na produção dos extratos. Após o período de incubação a formação de halo de crescimento das culturas das linhagens testadas foi avaliada, assim como os halos obtidos em ação dos controles (SAVI *et al.*, 2015). A TABELA 3 apresenta as linhagens utilizadas na metodologia, assim como os respectivos antibióticos de ação comprovada.

TABELA 3 - PATÓGENOS CLÍNICOS UTILIZADOS NO TESTE DE DIFUSÃO EM DISCO E OS RESPECTIVOS ANTIBIÓTICOS DE AÇÃO COMPROVADA.

Classificação	Abreviação	Patógeno Clínico	Antibiótico de Ação Comprovada
Gram-positiva	MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA)	Oxacilina
Gram-positiva	<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Oxacilina
Gram-positiva	<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	Vancomicina
Gram-negativa	<i>E. cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	Vancomicina, meropenem
Gram-negativa	<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Vancomicina, meropenem
Gram-negativa	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	Ampicilina
Gram-negativa	KPC	KPC ( <i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase)	Vancomicina, meropenem
Gram-negativa	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Vancomicina, meropenem
Gram-negativa	<i>S. maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Vancomicina, meropenem
Fungo	<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	Anfotericina

FONTE: O Autor.

#### 4.2.3. Avaliação da Atividade Larvícida dos Extratos

A avaliação da atividade larvícida ocorreu com extratos obtidos a partir da fase de biomassa microalgal do cultivo alternativo realizado nos FBR's do NPDEAS. O experimento consistiu inicialmente na preparação de soluções a partir do extrato nas concentrações de 100, 300 e 500 ppm. Para tanto os extratos, após produzidos, foram solubilizados em 1,4% de dimetilsulfóxido (DMSO) juntamente com água destilada, a qual foi acrescida até o volume final de 100 mL, para cada concentração.

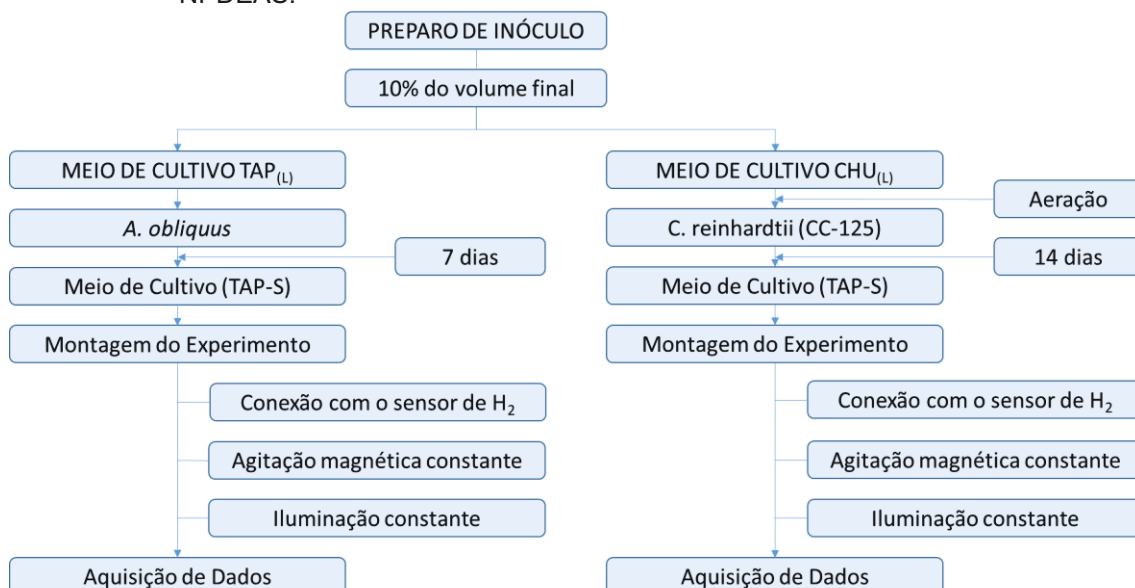
O experimento envolveu, para cada concentração, a utilização de 20 larvas da linhagem Rockfeller da em estágio larval correspondente ao 4º instar. Para cada concentração o experimento foi realizado em triplicata. A metodologia do experimento consistiu, então na preparação das soluções e na deposição das larvas para posterior avaliação da mortalidade nos períodos de 24 e 48 horas. Porém a concentração letal responsável pela mortalidade de 50% da população larval (LC50), foi determinada com a mortalidade observada após o período de 48 horas do experimento, esta taxa foi determinada utilizando o método de análise de regressão. A mortalidade larval foi determinada quando as larvas não respondiam a estímulos mecânicos e/ou quando não emergiam a superfície da solução. O experimento também contou

com um controle negativo contendo 1,4% de DMSO em 100 mL de água destilada.

#### 4.3. PRODUÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE HIDROGÊNIO

A metodologia de produção e quantificação de hidrogênio para a linhagem de microalgas isolada (LGMM0001), seguiu o processo descrito nos itens 4.2.1. e 4.2.2. Onde os passos são apresentados no fluxograma da FIGURA 8.

FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA METODOLOGIA APLICADA PARA A IDENTIFICAÇÃO DA LINHAGEM DE MICROALGA UTILIZADA NOS FBR'S DO NPDEAS.



FONTE: O Autor.

##### 4.3.1. Produção de Hidrogênio

A metodologia para a produção do hidrogênio consistiu no cultivo da microalga em duas etapas. A primeira com o cultivo do inóculo em meio TAP completo (TABELA 4), e a segunda com o cultivo em meio com depleção de enxofre (TABELA 5), o qual induz a produção do gás de interesse (LAURINAVICHENE *et al.*, 2002).

TABELA 4 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO TAP (TRIS-ACETATE-PHOSPHATE).

Componentes	Concentração em Solução Estoque	Quantidade para 1.000 mL de meio
NH <sub>4</sub> Cl	100,0 g	5,0 mL
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4,0 g	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2,0 g	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	28,8 g·100 mL <sup>-1</sup>	5,0 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14,4 g·100 mL <sup>-1</sup>	
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	50,0 g·250 mL <sup>-1</sup>	1,0 mL
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	22,0 g·100 mL <sup>-1</sup>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11,4 g·200 mL <sup>-1</sup>	
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	5,06 g·50 mL <sup>-1</sup>	
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4,99 g·50 mL <sup>-1</sup>	
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,61 g·50 mL <sup>-1</sup>	
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1,57 g·50 mL <sup>-1</sup>	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>5</sub> MoO <sub>3</sub>	1,10 g·50 mL <sup>-1</sup>	
CH <sub>3</sub> COONa·3H <sub>2</sub> O	300,0 g	5,0 mL

FONTE: Culture collection of Cryophilic Algae (CCCrho).

TABELA 5 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO TAP-S (TRIS-ACETATE-PHOSPHATE FREE EN SULFUR).

Componentes	Concentração em Solução Estoque	Quantidade para 1.000 mL de meio
NH <sub>4</sub> Cl	100,0 g	5,0 mL
MgCl <sub>2</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4,0 g	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2,0 g	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	28,8 g·100 mL <sup>-1</sup>	5,0 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14,4 g·100 mL <sup>-1</sup>	
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	50,0 g·250 mL <sup>-1</sup>	1,0 mL
ZnCl <sub>2</sub> ·7H <sub>2</sub> O	22,0 g·100 mL <sup>-1</sup>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11,4 g·200 mL <sup>-1</sup>	
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	5,06 g·50 mL <sup>-1</sup>	
FeCl <sub>2</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4,99 g·50 mL <sup>-1</sup>	
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,61 g·50 mL <sup>-1</sup>	
CuCl <sub>2</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1,57 g·50 mL <sup>-1</sup>	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>5</sub> MoO <sub>3</sub>	1,10 g·50 mL <sup>-1</sup>	
CH <sub>3</sub> COONa·3H <sub>2</sub> O	300,0 g	5,0 mL

FONTE: Culture collection of Cryophilic Algae (CCCrho).

Os inóculos foram mantidos em condição controladas de luz, temperatura, umidade e concentração de dióxido de carbono respectivamente (125 µmol, 22 °C, 36% e 356 PPM), pelo período de 7 dias, sem a adição de CO<sub>2</sub>, através de aeração do sistema. Ao fim deste período o inóculo foi adicionado ao meio TAP livre de enxofre (TAP-S).

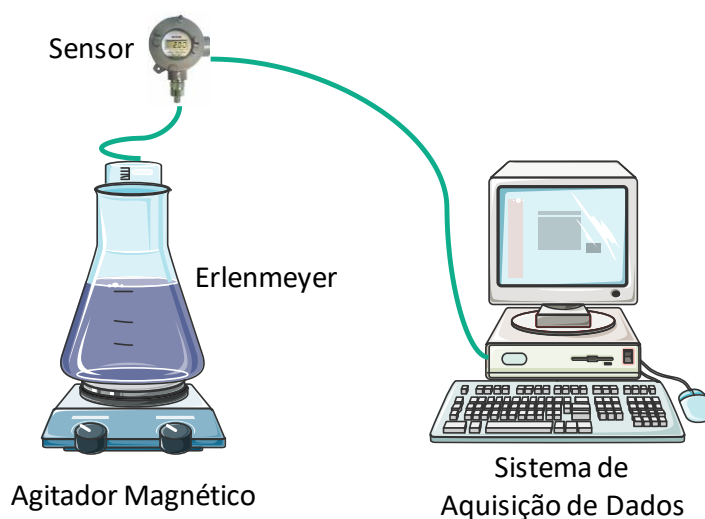
#### 4.3.2. Quantificação do Hidrogênio

A quantificação do hidrogênio produzido foi realizada pela leitura do gás em um sistema de aquisição de dados utilizado nos experimentos durante

a coleta quantitativa de dados, é constituído de um computador contendo duas placas da *National Instruments*, uma de controle e outra de Multímetro, capaz de realizar 60 leituras por segundo de dados com tensão (AC e DC), corrente (AC e DC) e/ou medição de resistência em dois, três ou quatro fios. Por intermédio da placa multímetro são realizadas as leituras de todo o conjunto de sensores instalados. O armazenamento e a manipulação dos dados são realizados por programa desenvolvido no LABVIEW (DIAS, 2017).

A medição de temperatura foi realizada por termistores do modelo 521-3dc, fabricado pela Nova Ética, com faixa de registro de temperatura de  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com resolução de leitura de  $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Equipamento certificado e calibrado RBC e com validação física, referente a distribuição de temperatura em sua cuba, com relatório emitido pelo fabricante. Para a medição das concentrações de  $\text{H}_2$  foi utilizado um sensor de hidrogênio modelo TGas-1031- $\text{H}_2$  (*Globe Instruments*). O sensor apresenta capacidade de leitura até 2027 ppm de  $\text{H}_2$  com incerteza de  $\pm 2$  ppm por leitura. A FIGURA 9, mostra o esquema de montagem do aparato de leitura e quantificação do hidrogênio produzido com a metodologia desenvolvida.

FIGURA 9 - ESQUEMA DA MONTAGEM DO EXPERIMENTO PARA PRODUÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE HIDROGÊNIO.



FONTE: O AUTOR.

## 5. RESULTADOS

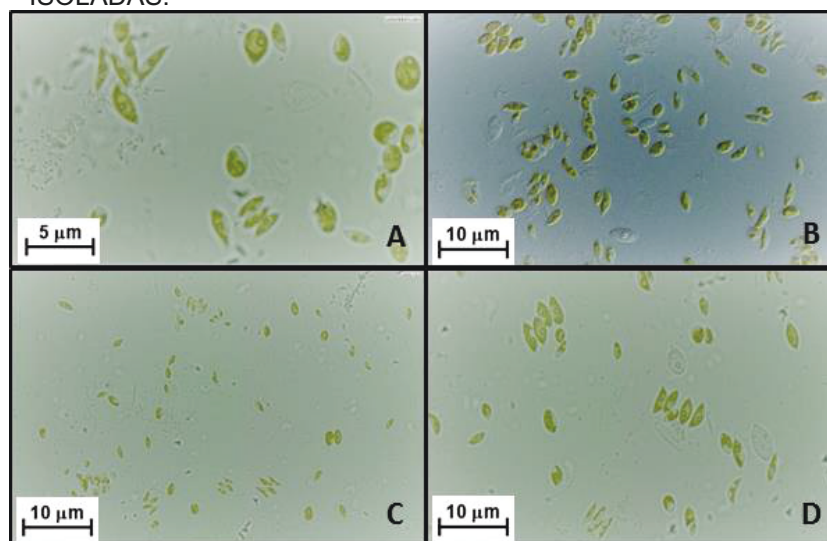
Os resultados são apresentados seguindo a divisão apresentada nos objetivos específicos para a elaboração desta dissertação.

### 5.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MICROALGAS

#### 5.1.1. Análise Morfológica

A análise morfológica realizada através de microscopia, mostrou características gerais compartilhadas pelos gêneros *Scenedesmus* e *Acutodesmus*, como células ovais ou cilíndricas com pólos obtusos ou truncados, sem espinhos, em coenóbios planos ou ligeiramente curvos e paredes celulares lisas (KRIENITZ; BOCK, 2012). Tais características podem ser observadas nas imagens apresentadas na FIGURA 10. A plasticidade nas características morfológicas desses gêneros reforça a necessidade de mais estudos para a correta classificação das espécies neste grupo po análise molecular (LÜRLING, 2003).

FIGURA 10 - IMAGENS OBTIDAS EM MICROSCOPIA DAS LINHAGENS DE MICROALGAS ISOLADAS.



FONTE: O Autor.

NOTA: A – Isolado MA-1; B – Isolado MA-2; C - Isolado MA-3 e D – Isolado MA-4

### 5.1.2. Purificação e Identificação

As linhagens obtidas, com a aplicação da metodologia de diluição seriada, foram submetidas a cultivo em meio líquido para obtenção de biomassa e consequente purificação do DNA genômico.

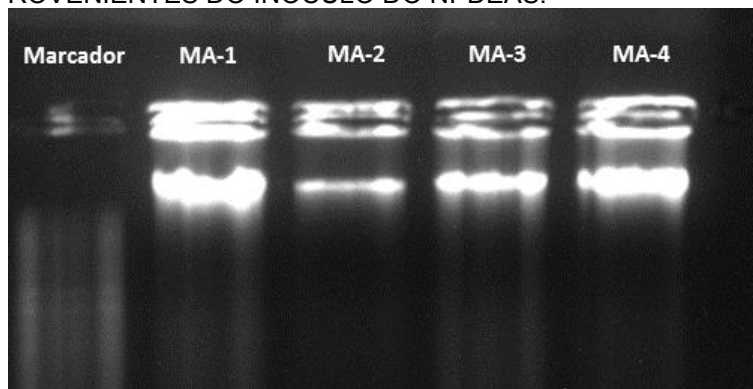
Após a aplicação do kit de purificação do DNA genômico os valores referentes a quantificação do DNA obtido são apresentados na TABELA 6. Além disso, o DNA genômico está em qualidade suficiente para o uso em sequenciamento, ou seja, sem proteínas e íntegro como pode ser visualizado na FIGURA 11.

TABELA 6 - RESULTADOS OBTIDOS EM QUANTIFICAÇÃO POR NANODROP, E DILUIÇÃO APLICADA.

LINHAGEM	CONCENTRAÇÃO (ng/μL)	$\Lambda$ (nm)	RAZÃO	DILUIÇÃO
MA-1	139,1	260/280	1,89	10:40
MA-2	35,8	260/280	1,77	-
MA-3	71,4	260/280	1,69	10:20
MA-4	113,7	260/280	1,88	10:40

FONTE: O autor.

FIGURA 11 - DNA GENÔMICO DOS 4 MORFOTIPOS DAS LINHAGENS DE MICROALGAS PROVENIENTES DO INÓCULO DO NPDEAS.

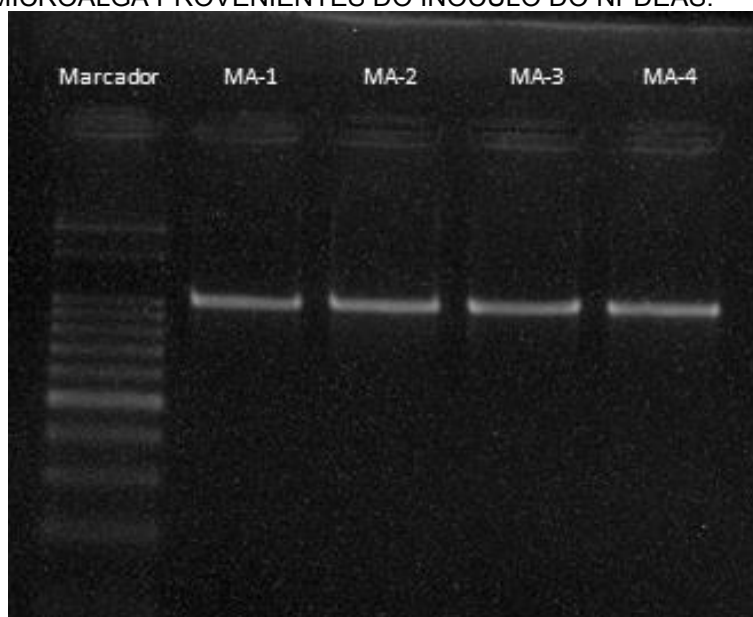


FONTE: O Autor

NOTA: Eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 1x. Marcador *hind*.

A PCR dos 4 morfotipos obtidos apresentou banda única do tamanho esperado para os primers utilizados, 1000 bp FIGURA 12.

FIGURA 12 - PRODUTO DA REAÇÃO DE PCR DOS 4 MORFOTIPOS DA LINHAGEM DE MICROALGA PROVENIENTES DO INÓCULO DO NPDEAS.



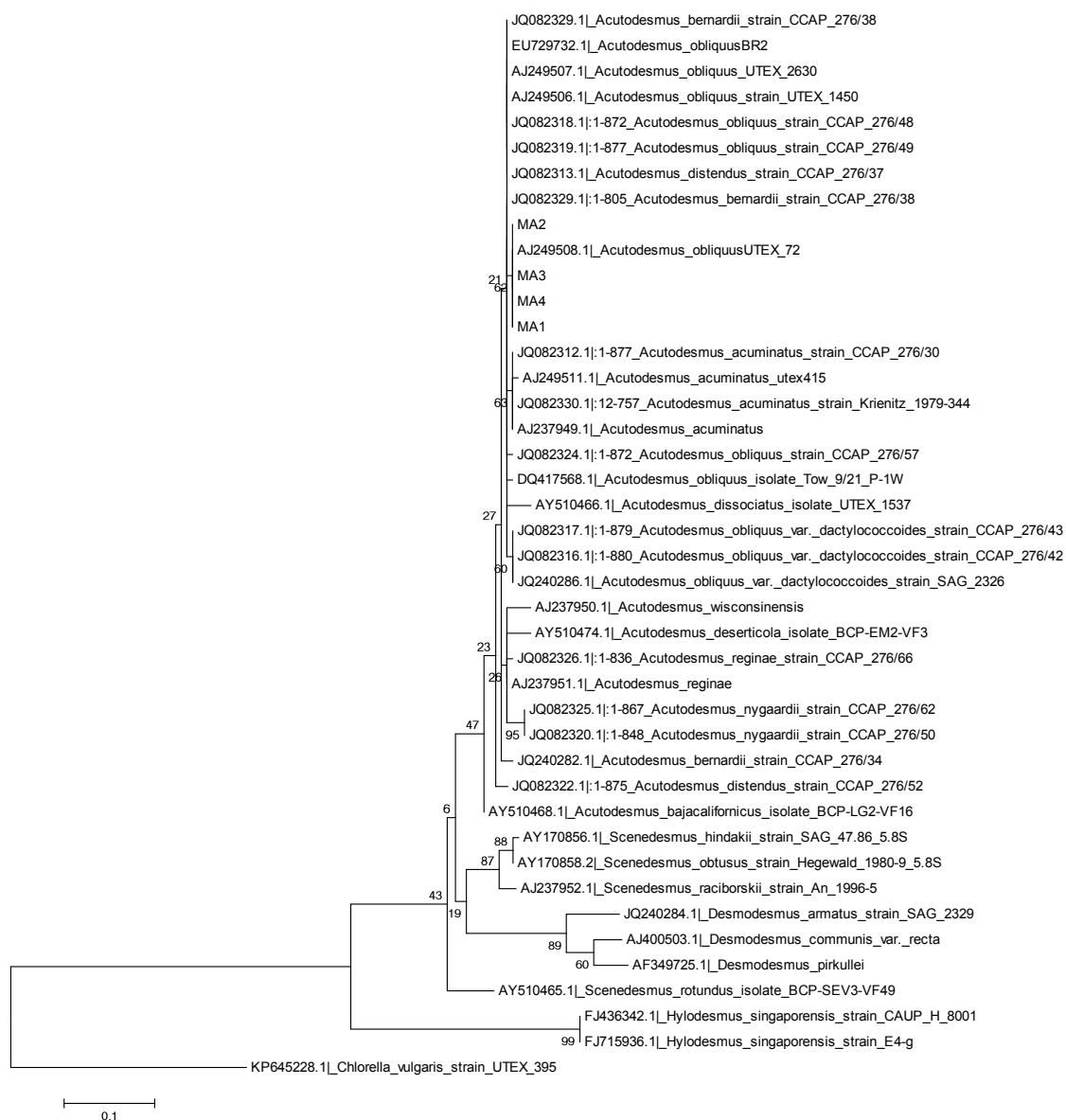
FONTE: O Autor.

NOTA: Gel de agarose 1,5% corado com GelRed. Marcador lader.

As sequências de ITS obtidas foram comparadas com as sequências depositadas no banco de dados genbank e apresentaram 100% de similaridade com a sequência da espécie tipo *Acutodesmus obliquus*. A análise de máxima verossimilhança utilizando as sequências de referencia pertencentes ao gênero *Acutodesmus*, confirmou os isolados como pertecendo a espécie *A. obliquus* (FIGURA 13). A espécie *Chlorella vulgaris* foi utilizada como grupo externo.



FIGURA 13 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA (ML) CONSTRUÍDA A PARTIR DE DADOS DE SEQUÊNCIAS QUE ABRANGEM REGIÕES DE DNA RIBOSSOMAL ITS1, 5.8S E ITS2.



FONTE: O Autor.

NOTA: A barra, 0,1 é o valor de substituições por nucleotídeos e os valores mostrados nos braços da árvore indica o *bootstrap* expresso em valores de porcentagem. *Chlorella vulgaris* foi utilizada como outgroup

## 5.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS

### 5.2.1. Produção de Extratos

As concentrações de metabólitos secundários em diferentes meios de cultivo são apresentadas na TABELA 7. Extratos produzidos a partir da biomassa microalgal apresentaram o maior rendimento mássico, superior a 50% em relação a fase de meio de cultivo residual para os três meios de cultivos investigados.

O melhor rendimento foi obtido a partir do cultivo em meio TAP (41, 24 e 22 mg de extrato obtido em cada repetição), seguido do meio alternativo e em último no meio CHU

TABELA 7 - RENDIMENTO MÁSSICO DOS EXTRATOS OBTIDOS COM OS MEIOS DE CULTIVO CHU, TAP E CULTIVO EM MEIO ALTERNATIVO.

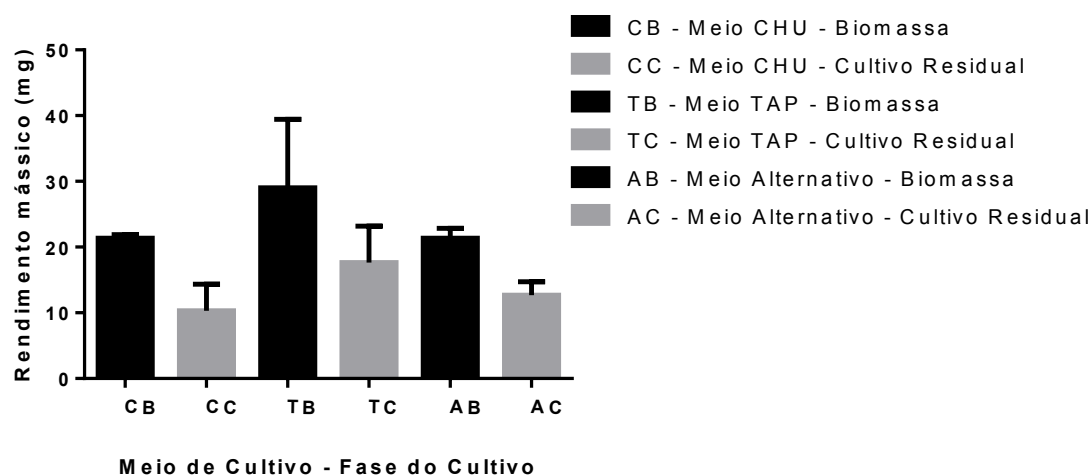
Meio de Cultio	Biomassa	Cultivo Residual
Meio CHU	21 mg	6 mg
	21 mg	14 mg
	22 mg	11mg
Meio TAP	41 mg	24mg
	24 mg	14mg
	22 mg	15 mg
Meio Alternativo	20 mg	15 mg
	23 mg	11 mg
	21 mg	12 mg

FONTE: O autor.

A produção de extratos ocorreu em triplicata para cada meio de cultivo (CHU, TAP e meio alternativo), os extratos produzidos foram utilizados em teste de difusão em disco para verificar a atividade antibacteriana contra patógenos clínicos.

Os valores de rendimento mássico dos extratos, apresentados na TABELA 7, foram utilizados na construção da representação gráfica apresentada na FIGURA 14, onde podemos visualizar que o rendimento mássico obtido a partir da biomassa microalgal cultivada em meio TAP, apresentou os melhores resultados, seguido com os valores obtidos com os extratos de biomassa cultivados em meio alternativo e meio CHU.

FIGURA 14 - RENDIMENTO MÁSSICO DOS EXTRATOS OBTIDOS COM OS MEIOS DE CULTIVO CHU, TAP E CULTIVO EM MEIO ALTERNATIVO.



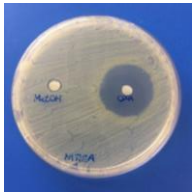
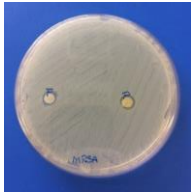
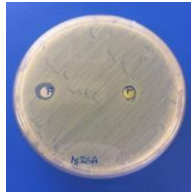
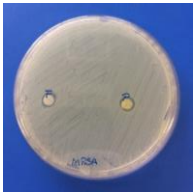

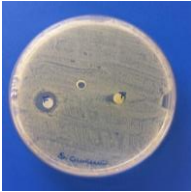
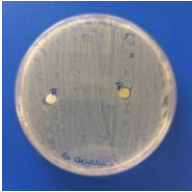
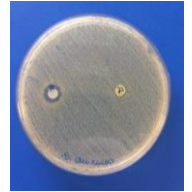
FONTE: O autor.

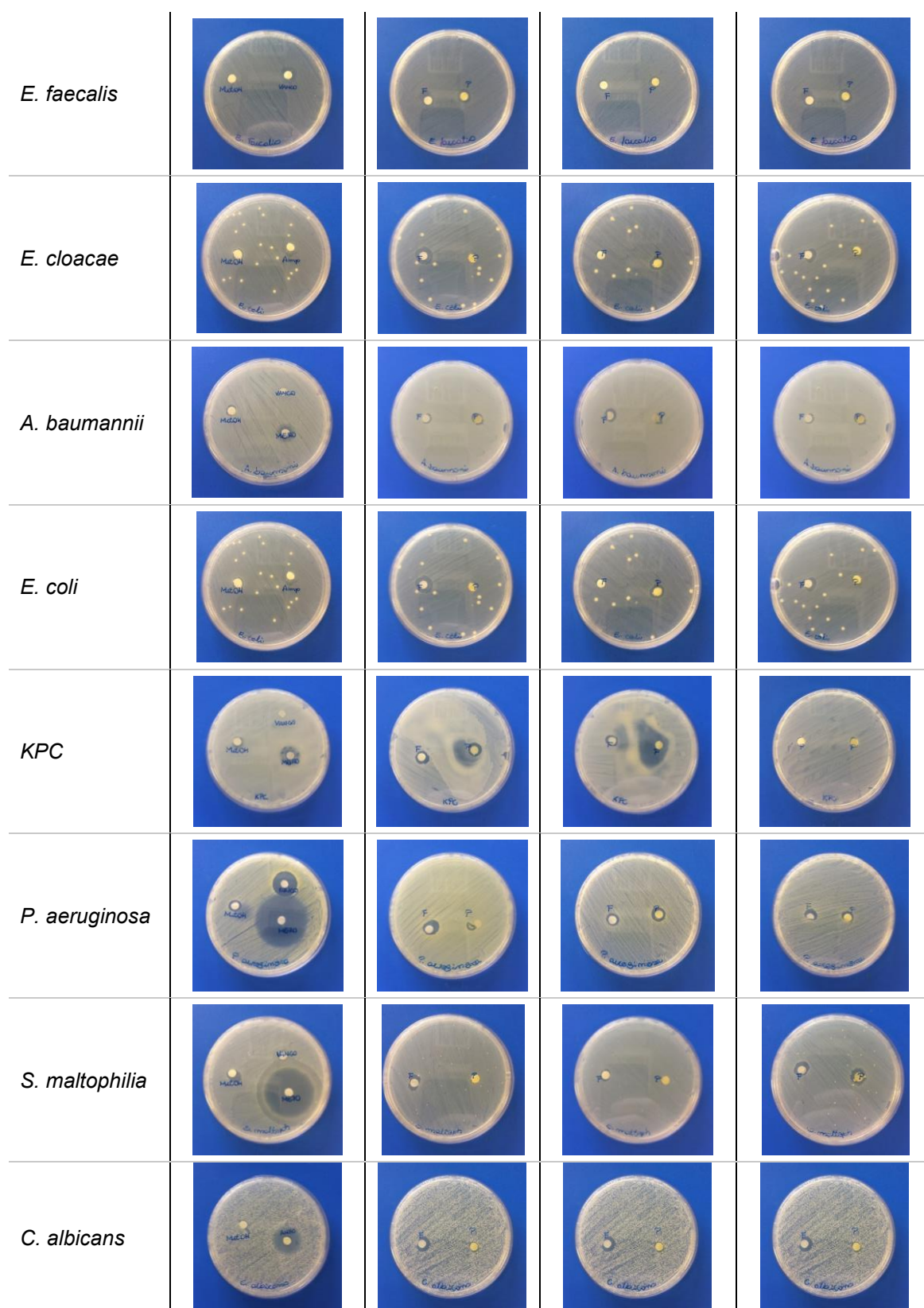
NOTA: Os rendimentos mássicos dos extratos obtidos com as respectivas barras de erro utilizadas para indicar a incerteza em um valor.

### 5.2.2. Atividade Antibacteriana contra Patógenos Clínicos – Teste de difusão em disco

A atividade biológica frente a ação antibacteriana contra patógenos clínicos, foi avaliada através do teste de difusão em disco. O qual foi realizado em triplicata para cada linhagem de patógeno. A TABELA 8 mostra os resultados das placas de cultivo após 24 horas de cultivo, onde os valores dos halos de inibição formados foram mensurados.

TABELA 8 - IMAGENS DO TESTE DE DIFUSÃO EM DISCO REALIZADO COM EXTRATOS METABÓLICOS.

Patógeno Clínico	Controle	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
MRSA				
<i>S. aureus</i>				



Fonte: O autor.

Os valores referentes aos halos de inibição formados no teste de difusão em disco realizados com as duas fases de cultivo (biomassa e cultivo

residual) feito com os meios CHU, TAP e Meio de cultivo alternativo, são apresentados na TABELA 9.

Com os valores apresentados foi possível realizar a construção dos gráficos apresentados na sequência. A FIGURA 15, apresenta os gráficos referentes aos valores médios dos halos de inibição e respectivas barras de significância, para cada linhagem de patógeno clínico: MRSA, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* e KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase). E a FIGURA 16, apresenta os gráficos referentes aos valores médios dos halos e respectivas barras de significância, para as linhagens de patógenos *Candida albicans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*.

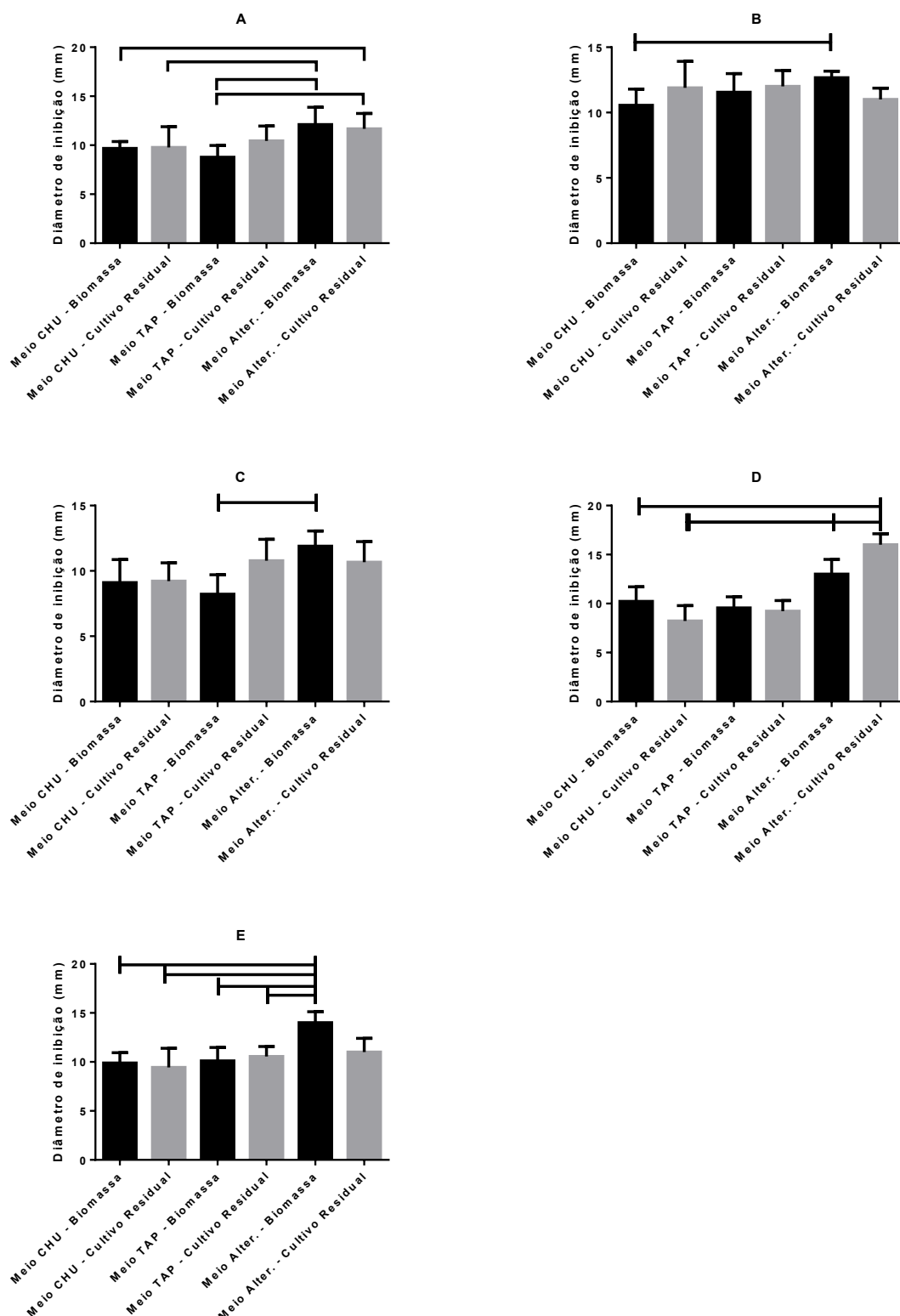
TABELA 9 - VALORES DE HALOS DE INIBIÇÃO PARA TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE MICROALGAS PRODUZIDOS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO FRENTE A PATÓGENOS CLÍNICOS.

Patógeno Clínico		Meio CHU		Meio TAP		Meio Alternativo	
		Biomassa	Cultivo residual	Biomassa	Cultivo residual	Biomassa	Cultivo residual
Gram-positiva	MRSA	9,67±0,71 mm	9,78±2,11 mm	8,78±1,20 mm	10,44±1,51 mm	12,11±1,76 mm	11,67±1,58 mm
Gram-positiva	<i>S. aureus</i>	10,22±1,48 mm	8,22±1,56 mm	9,55±1,13 mm	9,22±1,09 mm	13,00±1,50 mm	16,00±1,12 mm
Gram-positiva	<i>E. faecalis</i>	10,83±2,00 mm	10,89±1,45 mm	11,00±0,0 mm	11,00±0,87 mm	10,22±1,72 mm	13,00±2,12 mm
Gram-negativa	<i>E. cloacae</i>	10,56±1,24 mm	11,89±2,03 mm	11,56±1,42 mm	12,00±1,23 mm	12,67±0,50 mm	11,00±0,87 mm
Gram-negativa	<i>A. baumannii</i>	9,11±1,76 mm	9,22±1,39 mm	8,22±1,48 mm	10,78±1,64 mm	11,89±1,17 mm	10,67±1,58 mm
Gram-negativa	<i>E. coli</i>	10,67±1,80 mm	9,45±2,24 mm	11,33±0,87 mm	11,22±0,67 mm	13,00±2,24 mm	11,67±2,12 mm
Gram-negativa	KPC	9,89±1,05 mm	9,45±1,94 mm	10,11±1,36 mm	10,56±1,01 mm	14,00±1,12 mm	11,00±1,41 mm
Gram-negativa	<i>P. aeruginosa</i>	11,00±0,87 mm	10,22±1,64 mm	11,00±1,80 mm	10,22±1,09 mm	13,67±2,00 mm	13,00±2,24 mm
Gram-negativa	<i>S. maltophilia</i>	11,67±1,94 mm	9,11±2,15 mm	11,22±0,83 mm	10,44±1,13 mm	12,00±1,87 mm	13,67±2,18 mm
Fungo	<i>C. albicans</i>	9,22±1,99 mm	8,00±1,73 mm	10,78±1,39 mm	10,44±1,94 mm	11,67±1,73 mm	15,00±1,12 mm

FONTE: O Autor.

NOTA: Média ± desvio padrão. MRSA - Controle positivo (Oxacilina 1µg/disco): 27,0 ± 2,5 mm; Controle negativo (Metanol): 0,0 mm. *Enterobacter cloacae* - Controle Positivo (Meropenem 10µg/disco): 25,0 ± 1,0 mm; Controle negativo (Metanol): 0,0 mm. *Acinetobacter baumannii* - Controle positivo (Vancomicina 30µg/disco): 0,0 mm e (Meropenem 10µg/disco): 13,0 ± 1,5 mm; Controle negativo (Metanol): 0,0 mm. *Staphylococcus aureus* metilicina sensível - Controle positivo (Oxacilina 6µg/disco): 30,0 ± 3,1 mm; Controle negativo (Metanol): 0,0 mm. KPC - Controle positivo (Meropenem 10µg/disco): 14,0 ± 2,1 mm; Controle negativo (Metanol): 0,0 mm. *Candida albicans* - Controle positivo (Anfotericina B 5µg/disco): 20,0 ± 5,0 mm; Controle negativo (Metanol): 0,0 mm. *Stenotrophomonas maltophilia* - Controle positivo (Meropenem 10µg/disco): 38,0 ± 7,0 mm; Controle negativo (Metanol): 0,0 mm. *Pseudomonas aeruginosa* - Controle positivo (Meropenem 10µg/disco): 34,0 ± 3,5 mm; Controle negativo (Metanol): 0,0 mm. *Escherichia coli* - Controle positivo (Ampicilina 10µg/disco): 32,0 ± 2,5 mm; Controle negativo (Metanol): 0,0 mm. *Enterococcus faecalis* - Controle Positivo (Vancomicina 30 µg/disco): 15,0 ± 3,0 mm; Controle negativo (Metanol): 0,0 mm.

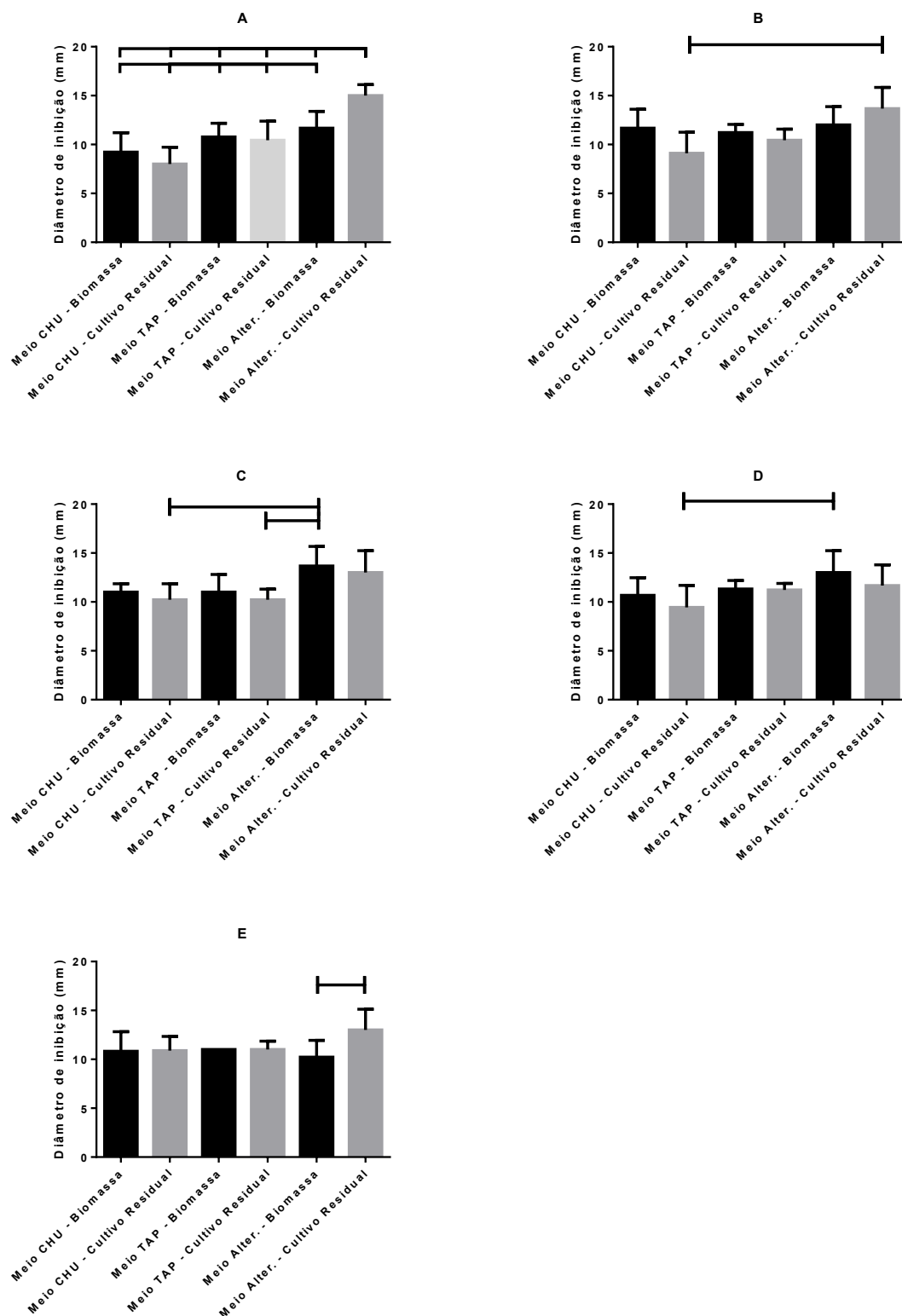
FIGURA 15 - GRÁFICOS REFERENTES AS MÉDIAS DOS VALORES DOS HALOS DE INIBIÇÃO PARA CADA LINHAGEM DE PATÓGENOS CLÍNICO.



FONTE: O Autor.

LEGENDA: A – MRSA; B - *Enterobacter cloacae*; C - *Acinetobacter baumannii*; D - *Staphylococcus aureus* e E - KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase).

FIGURA 16 - GRÁFICOS REFERENTES AS MÉDIAS DOS VALORES DOS HALOS DE INIBIÇÃO PARA CADA LINHAGEM DE PATÓGENOS CLÍNICO.



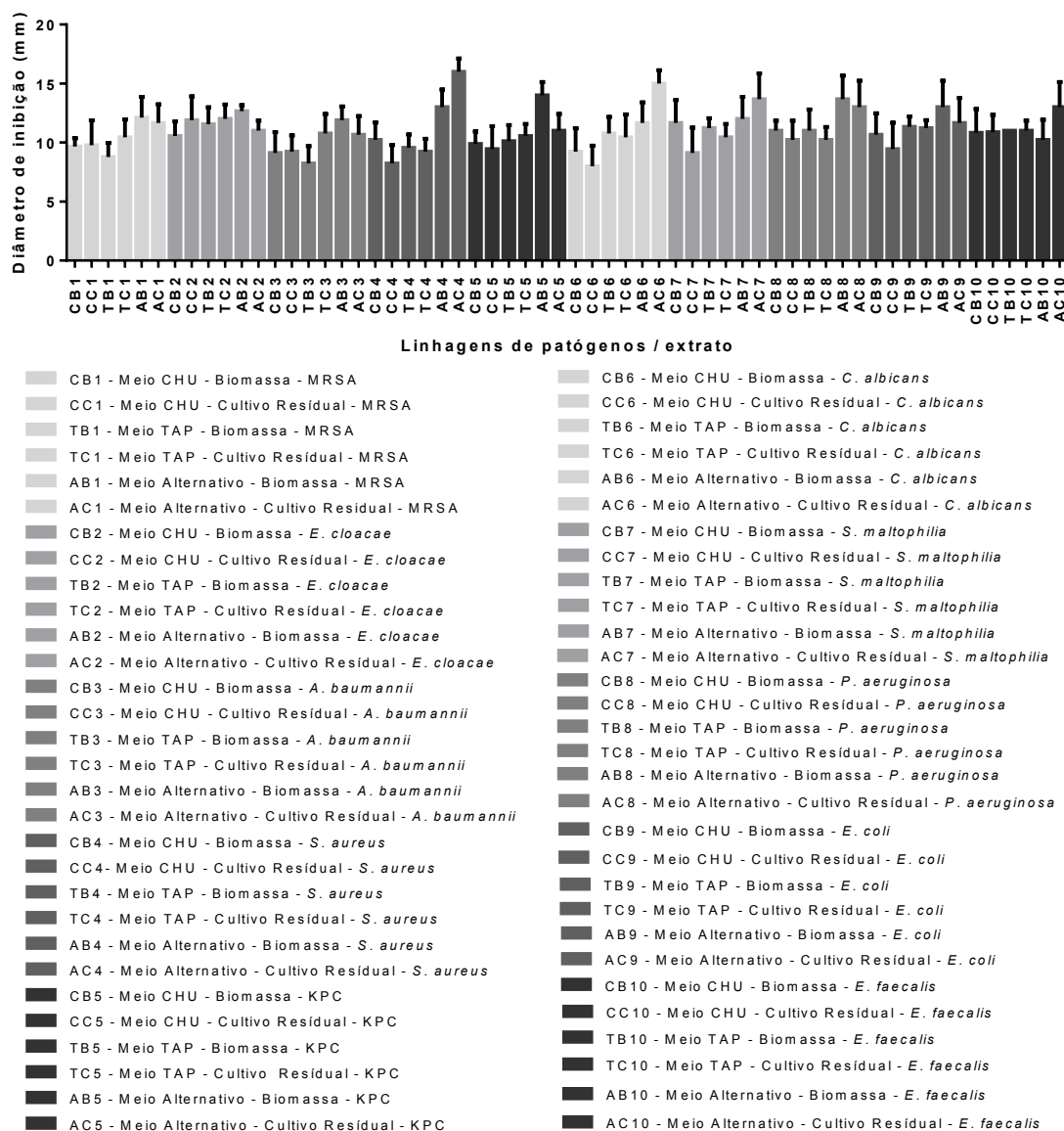
FONTE: O Autor.

LEGENDA: A – *Candida albicans*; B – *Stenotrophomonas maltophilia*; C – *Pseudomonas aeruginosa*; D – *Escherichia coli* e E – *Enterococcus faecalis*.



A FIGURA 17 apresenta todos os valores obtidos para cada fase do cultivo de biomassa microalgal com os respectivos meios de cultivo pesquisados. Os resultados são separados por linhagem de patógeno clínico e por fase de cultivo.

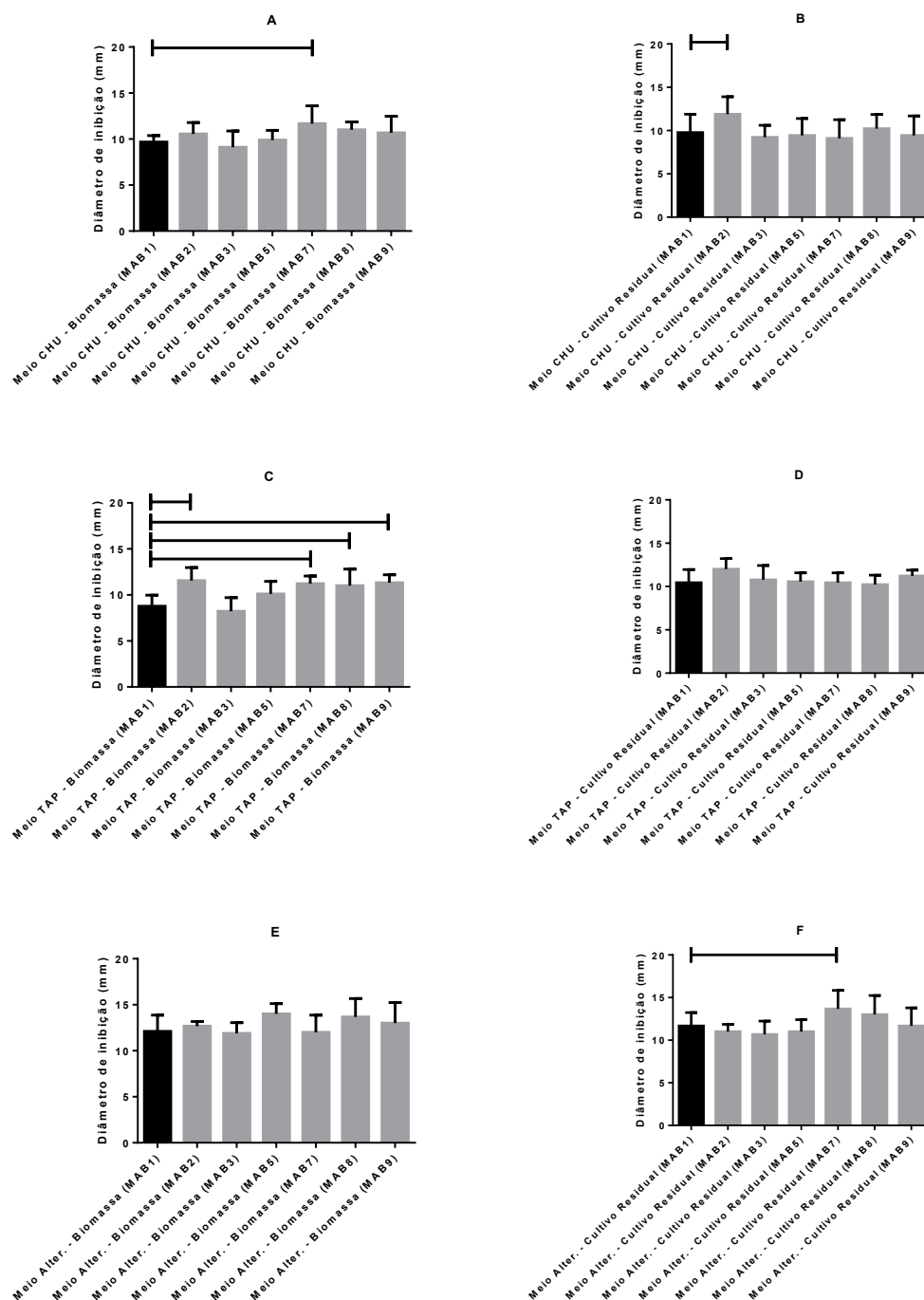
FIGURA 17 - GRÁFICO REFERENTE A MÉDIA DOS VALORES DOS HALOS DE INIBIÇÃO PARA CADA MEIO DE CULTIVO E FASE DE CULTIVO E A RESPECTIVA LINHAGEM DE PATÓGENO CLÍNICO UTILIZADA NO TESTE.



FONTE: O autor

Com os dados obtidos foram possíveis também realizar comparações entre as ações dos extratos produzidos entre bacterias do tipo gram-negativa e gram-positivas. Desta forma as Figuras FIGURA 18, FIGURA 19 e FIGURA 20, apresentam essas comparações com as respectivas significâncias.

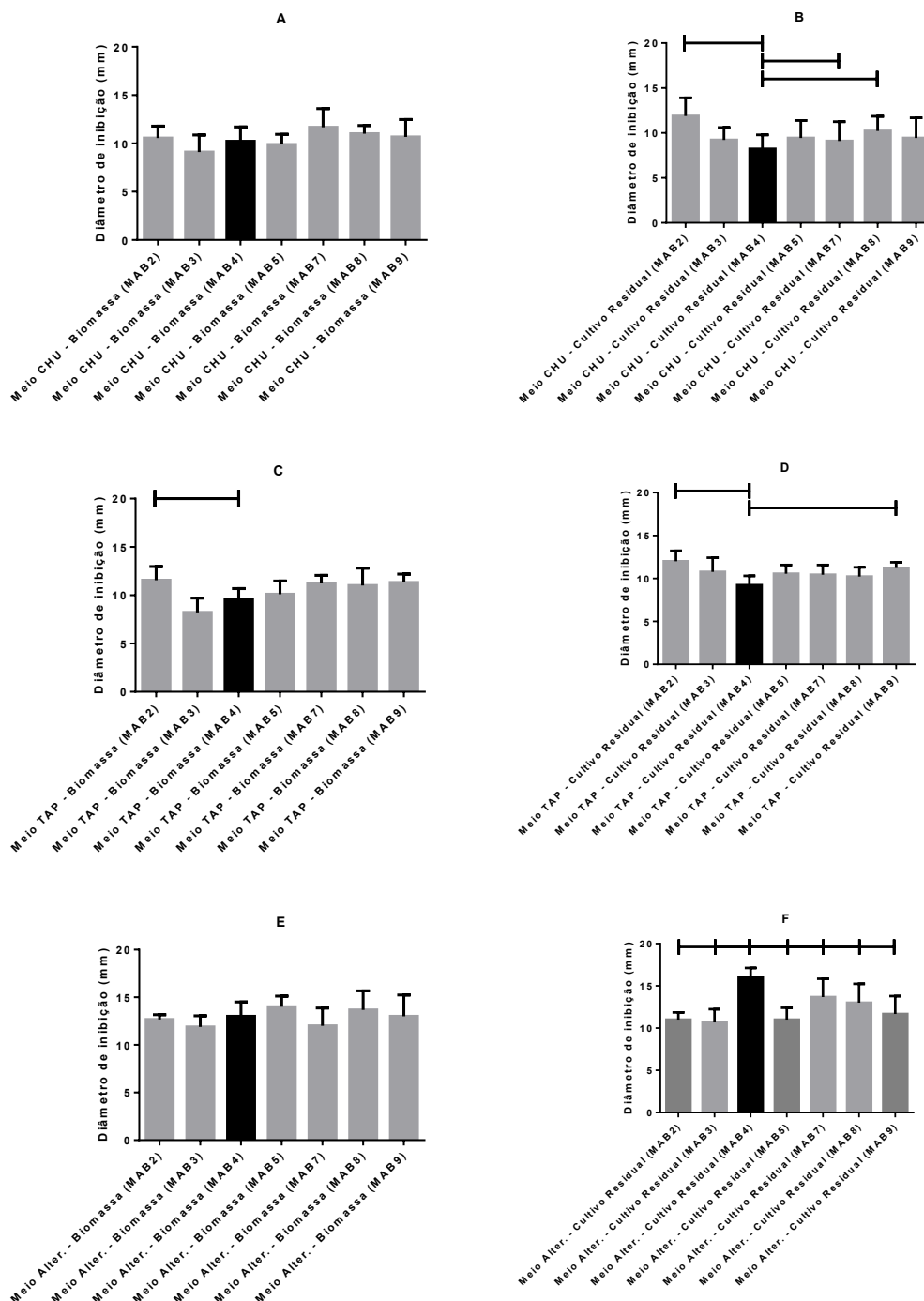
FIGURA 18 - GRÁFICOS REFERENTES AS MÉDIAS DOS VALORES DOS HALOS DE INIBIÇÃO PARA O PATÓGENO CLÍNICO MAB1 EM RELAÇÃO AOS PATÓGENOS CLÍNICOS MAB (2, 3, 5, 7, 8, 9).



FONTE: O Autor.

LEGENDA: A – Comparação entre os extratos produzidos com biomassa de microalgas em meio CHU, entre MAB1 e MAB (2, 3, 5, 7, 8, 9); B - Comparação entre os extratos produzidos com o cultivo residual de microalgas em meio CHU, entre MAB1 e MAB (2, 3, 5, 7, 8, 9); C - Comparação entre os extratos produzidos com biomassa de microalgas em meio TAP, entre MAB1 e MAB (2, 3, 5, 7, 8, 9); D - Comparação entre os extratos produzidos com o cultivo residual de microalgas em meio TAP, entre MAB1 e MAB (2, 3, 5, 7, 8, 9); E - Comparação entre os extratos produzidos com biomassa de microalgas em meio alternativo, entre MAB1 e MAB (2, 3, 5, 7, 8, 9) e F - Comparação entre os extratos produzidos com o cultivo residual de microalgas em meio alternativo, entre MAB1 e MAB (2, 3, 5, 7, 8, 9);

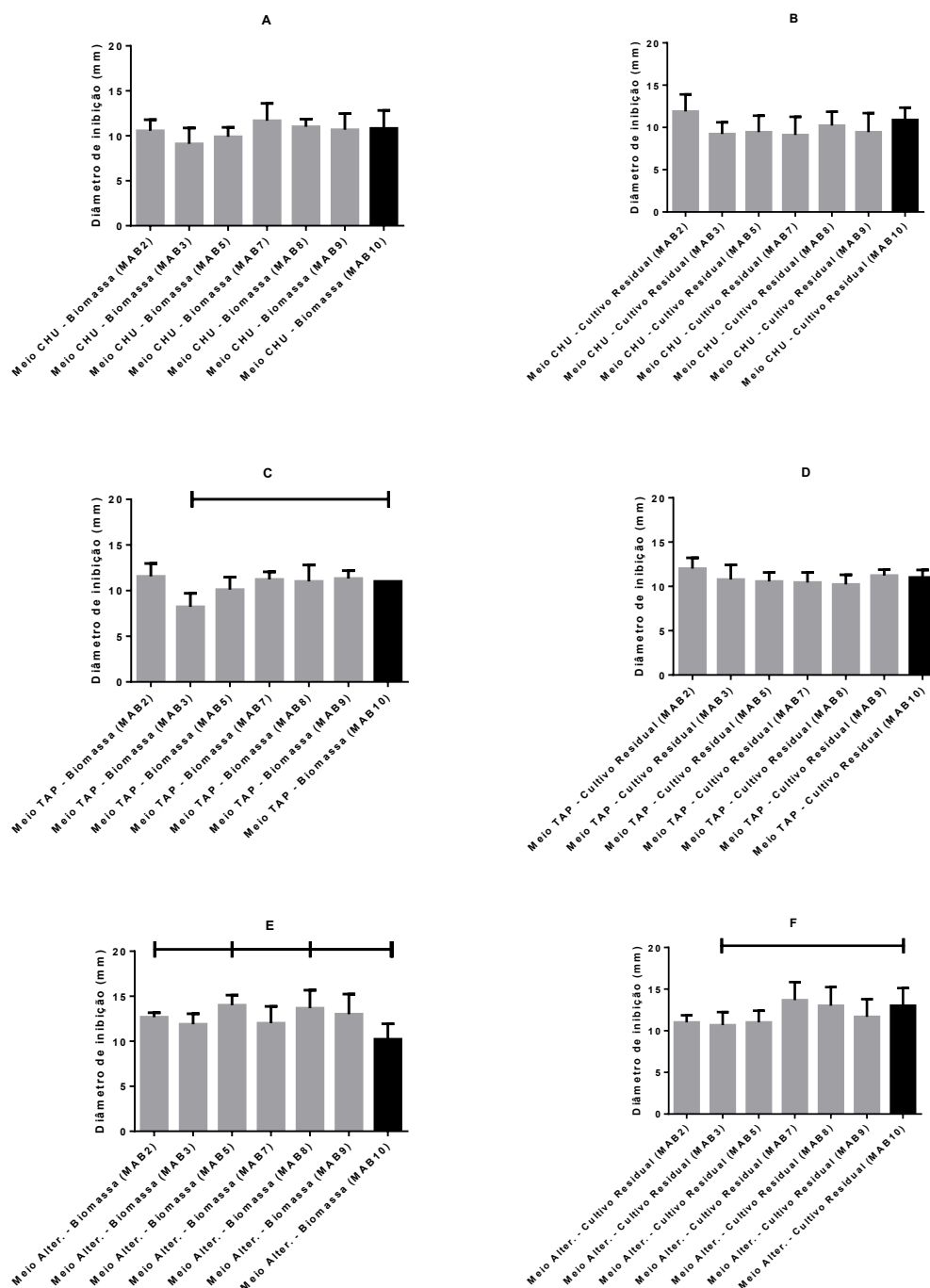
FIGURA 19 - GRÁFICOS REFERENTES AS MÉDIAS DOS VALORES DOS HALOS DE INIBIÇÃO PARA O PATÓGENO CLÍNICO MAB4 EM RELAÇÃO AOS PATÓGENOS CLÍNICOS MAB (2, 3, 5, 7, 8, 9).



FONTE: O Autor.

LEGENDA: A – Comparação entre os extratos produzidos com biomassa de microalgas em meio CHU, entre MAB4 e MAB (2, 3, 5, 7, 8, 9); B - Comparação entre os extratos produzidos com o cultivo residual de microalgas em meio CHU, entre MAB4 e MAB (2, 3, 5, 7, 8, 9); C - Comparação entre os extratos produzidos com biomassa de microalgas em meio TAP, entre MAB4 e MAB (2, 3, 5, 7, 8, 9); D - Comparação entre os extratos produzidos com o cultivo residual de microalgas em meio TAP, entre MAB4 e MAB (2, 3, 5, 7, 8, 9); E - Comparação entre os extratos produzidos com biomassa de microalgas em meio alternativo, entre MAB4 e MAB (2, 3, 5, 7, 8, 9) e F - Comparação entre os extratos produzidos com o cultivo residual de microalgas em meio alternativo, entre MAB4 e MAB (2, 3, 5, 7, 8, 9);

FIGURA 20 - GRÁFICOS REFERENTES AS MÉDIAS DOS VALORES DOS HALOS DE INIBIÇÃO PARA O PATÓGENO CLÍNICO MAB10 EM RELAÇÃO AOS PATÓGENOS CLÍNICOS MAB (2, 3, 5, 7, 8, 9).



FONTE: O Autor.

LEGENDA: A – Comparação entre os extratos produzidos com biomassa de microalgas em meio CHU, entre MAB10 e MAB (2, 3, 5, 7, 8, 9); B - Comparação entre os extratos produzidos com o cultivo residual de microalgas em meio CHU, entre MAB10 e MAB (2, 3, 5, 7, 8, 9); C - Comparação entre os extratos produzidos com biomassa de microalgas em meio TAP, entre MAB10 e MAB (2, 3, 5, 7, 8, 9); D - Comparação entre os extratos produzidos com o cultivo residual de microalgas em meio TAP, entre MAB10 e MAB (2, 3, 5, 7, 8, 9); E - Comparação entre os extratos produzidos com biomassa de microalgas em meio alternativo, entre MAB10 e MAB (2, 3, 5, 7, 8, 9) e F - Comparação entre os extratos produzidos com o cultivo residual de microalgas em meio alternativo, entre MAB10 e MAB (2, 3, 5, 7, 8, 9);

A atividade contra a bactéria gram-positiva, *S. aureus* resistente a meticilina (MAB1), apresenta os resultados obtidos variando de 7,58 a 13,87 mm, com os melhores resultados observados para os extratos produzidos a partir da biomassa e do cultivo residual obtidos com o cultivo em meio de cultivo alternativo. Com relação ao patógeno clínico *E. cloacae* (MAB2), bacteriana gram-negativa, os resultados obtidos variaram de 9,32 a 13,98 mm, com o melhor resultado observado para o extrato produzido a partir da biomassa microalgal obtida com o cultivo em meio alternativo. A linhagem gram-negativa *A. baumannii* (MAB3), mostrou zonas de inibição que variaram entre 6,74 e 13,06 mm, com o melhor resultado observado para o extrato produzido a partir da biomassa microalgal obtida com o cultivo em meio alternativo. Com relação ao patógeno clínico *S. aureus* sensível a meticilina (MAB4), bacteriana gram-positiva, os resultados obtidos variaram de 6,66 a 17,12 mm, com os melhores resultados observados para os extratos produzidos a partir da biomassa e do cultivo residual obtidos com o cultivo em meio alternativo. A linhagem gram-negativa KPC (MAB5), mostrou zonas de inibição que variaram entre 7,51 e 15,12 mm, com o melhor resultado observado para o extrato produzido a partir da biomassa microalgal obtida com o cultivo em meio alternativo.

As bactérias gram-negativas *C. albicans* (MAB6) e *S. maltophilia* (MAB7), apresentaram os melhores resultados com os extratos obtidos a partir do cultivo residual provenientes do cultivo com meio alternativo, com valores de diâmetro de inibição, respectivamente, entre 6,27 e 16,12 mm e entre 6,96 e 15,85 mm. As linhagens patogênicas *P. aeruginosa* (MAB8) e *E. coli* (MAB9), também gram-negativas, apresentaram, os melhores resultados com os extratos obtidos a partir da biomassa microalgal proveniente do cultivo com meio alternativo, com valores de diâmetro de inibição, respectivamente, entre 8,58 e 15,67 mm e entre 7,21 e 15,24 mm. E por fim a linhagem patogênica, gram-positiva, *E. faecalis* (MAB10) apresentou os melhores resultados com relação a formação de halos de inibição com o extrato obtido a partir do cultivo residual também proveniente do cultivo em meio alternativo, com valores de diâmetro de inibição, entre 8,50 e 15,12 mm.

Com relação a comparação entre o grupos gram-positivos e gram negativos dos patógenos clínicos utilizados, podemos observar, segundo os

gráficos realizados comparando cada linhagem de bactéria gram-positiva MAB1 (FIGURA 18), MAB4 (FIGURA 19) e MAB10 (FIGURA 20), com as linhagens de bactérias gram-negativa (MAB2, MAB 3, MAB5, MAB7, MAB8 e MAB9), para cada fase do cultivo em cada um dos meios, que em sua quase totalidade que os valores de inibição para as linhagens gram-negativas são maiores e do que para as linhagens gram-positivas. Comprovando assim a maior ação de todos os extratos frente a bactérias gram-negativas, do que em relação a linhagens gram-positivas.

### 5.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DOS EXTRATOS

Ao fim do período de 48 horas de experimento, foi realizada a contagem das larvas que atendiam aos critérios de mortalidade. Os valores coletados são apresentados na TABELA 10.

TABELA 10 - DADOS OBTIDOS APÓS 48 HORAS DE TRATAMENTO, NO EXPERIMENTO DE EXTRATO DE BIOMASSA DE MICROALGA CULTIVADO EM MEIO ALTERNATIVO.

<b>Concentração do Extrato (ppm)</b>	<b>Repetição 1</b>	<b>Repetição 2</b>	<b>Repetição 3</b>	<b>Médi da Mortalidade</b>	<b>% da Mortalidade</b>
0	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0
300	4	3	0	2,3	12
500	8	2	9	6,3	32

Fonte: O autor.

A partir dos dados coletados, através dos tratamentos estatísticos, foi possível determinar a dose letal LC50. Os valores determinados são apresentados na TABELA 11.

TABELA 11 - CONVERSÃO DOS VALORES EM FUNÇÃO LOGARÍTMICA E OBTENÇÃO DOS VALORES PROBABILÍSTICOS.

<b>Concentração (ppm)</b>	<b>Concentração (log)</b>	<b>% da Mortalidade</b>	<b>Valores probabilísticos</b>
100	2	0	-
300	2,477121255	12	3,82
500	2,698970004	32	4,63

Fonte: O autor.

O valor do LC50 foi determinado através dos valores obtidos pela regressão linear simples dos dados contidos na TABELA 11. Os valores dos coeficientes obtidos foram os valores de interseção e variável x, respectivamente,  $b = 3,65113619707452$  e  $a = -5,22430707764961$ . Utilizando a formulação de equação de primeiro grau ( $y = ax + b$ ), com o valor da variável,  $y$ , igual a 5, pois é o valor de LC50 a ser determinado. Assim sendo, substituindo os valores na equação, encontramos o valor de LC50 para o extrato testado de 632 ppm

## 5.4. PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO

A avaliação da produção de hidrogênio foi realizada em duplicata com a linhagem de *Tetrademus obliquus* (= *Acutodesmus obliquus*) (LGMM0001). Resultados positivos também foram observados para a linhagem de *Chlamydomonas reinhardtii* (CC-125, linhagem obtida *Chlamydomonas Resource Center*), utilizada como controle, e também realizada em duplicata. Os valores de concentração celular, do inóculo representando o momento inicial do experimento e os valores do fim do experimento, foram mensurados. Em todos os experimentos os valores de concentração celular ficaram em torno de  $10^4$ , tanto para o início dos experimentos quanto ao final. Para a linhagem LGMM0001 os valores médios iniciais e finais de concentração celular ficaram, respectivamente, em torno de  $4,025 \cdot 10^4$  e  $3,255 \cdot 10^4$  células/mL. E para a linhagem CC-125 os valores médios iniciais e finais de concentração celular ficaram, respectivamente, em torno de  $10,785 \cdot 10^4$  e  $7,24 \cdot 10^4$  células/mL. Os valores para cada repetição realizada são apresentados na TABELA 12.

TABELA 12 - VALORES DE CONCENTRAÇÃO CELULAR DO TEMPO INICIAL E FINAL DA PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO.

REPETIÇÃO	ESPÉCIE DE MICROALGA	CONCENTRAÇÃO INÓCULO (células/ml)	CONCENTRAÇÃO FINAL (células/mL)
1A	<i>Acutodesmus obliquus</i>	$4,81 \cdot 10^4$	$4,01 \cdot 10^4$
1B	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	$2,97 \cdot 10^4$	$4,48 \cdot 10^4$
2A	<i>Acutodesmus obliquus</i>	$3,24 \cdot 10^4$	$2,50 \cdot 10^4$
2B	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	$1,86 \cdot 10^5$	$1,00 \cdot 10^5$

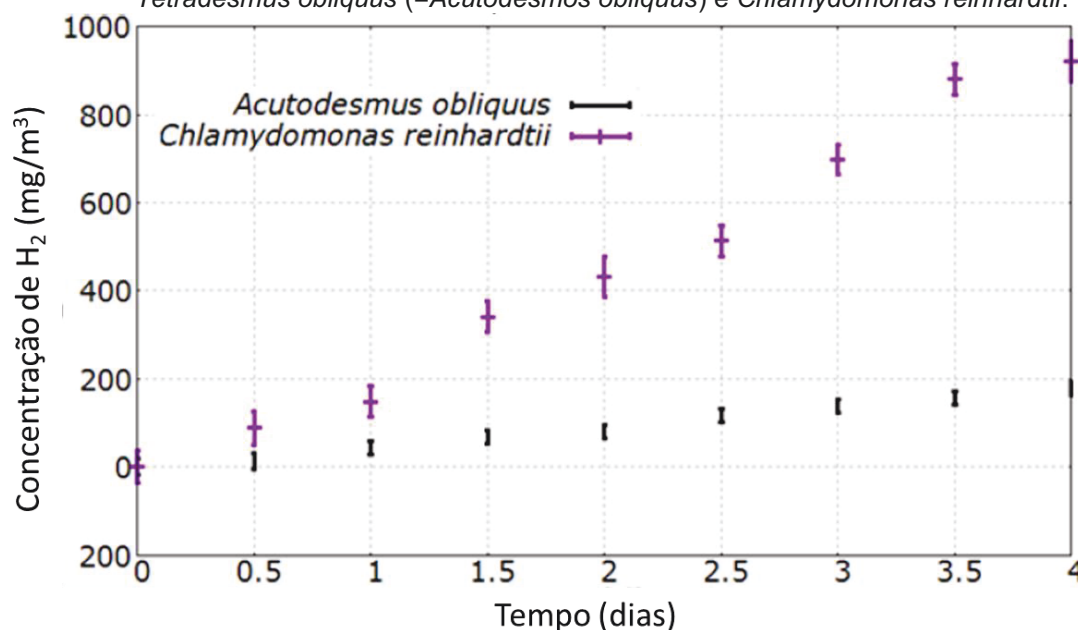
FONTE: O autor.

### 5.4.1. Quantificação de Hidrogênio

Os valores referentes a concentração de hidrogênio produzido ( $\text{mg/m}^3$ ) foram utilizados para construir os gráficos apresentados na FIGURA 21, referente a linhagem LGMM0001 de *A. obliquus* e da linhagem CC-125 de *C. reinhardtii*. As curvas desenhadas representam o padrão de produção de hidrogênio em relação ao tempo (em dias), em cada dia de produção para cada linhagem os pontos apresentam barra de erro.



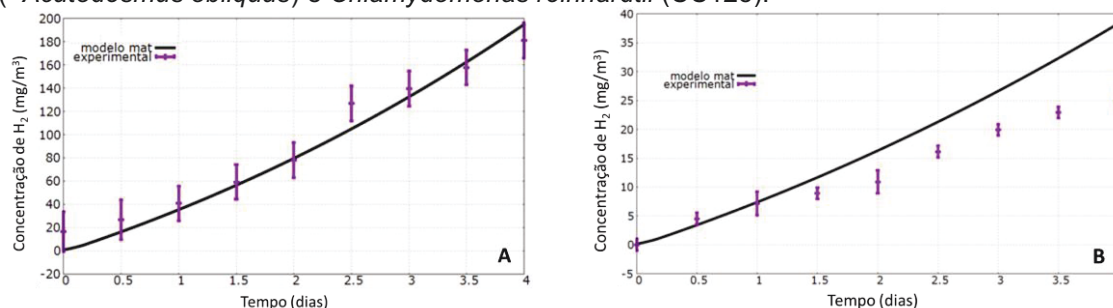
FIGURA 21 - VALORES OBTIDOS COM OS EXPERIMENTOS UTILIZANDO A LINHAGEM DE *Tetrademus obliquus* (= *Acutodesmos obliquus*) e *Chlamydomonas reinhardtii*.



FONTE: O autor.

Conforme metodologia descrita são apresentadas graficamente na FIGURA 21 os resultados experimentais de produção de hidrogênio pelas microalgas *Acutodesmos obliquus* (= *Tetrademus obliquus*) e *Chlamydomonas reinhardtii* linhagem CC125. A variação mais acentuada é observada nos primeiros 4 (quatro) dias de máxima produção do ciclo anaeróbico. Os dados obtidos experimentalmente foram utilizados em tese de doutorado para validar modelo matemático. A comparação entre as duas metodologias é apresentada na FIGURA 22.

FIGURA 22 - COMPARAÇÃO ENTRE MODELO MATEMÁTICO DE PRODUÇÃO DE HIDROGÊNIO AJUSTADO E VALORES EXPERIMENTAIS PARA *Tetrademus obliquus* (= *Acutodesmos obliquus*) e *Chlamydomonas reinhardtii* (CC125).



FONTE: DIAS, 2017.

LEGENDA: Gráfico A - *Tetrademus obliquus* (= *Acutodesmos obliquus*). Gráfico B - *Chlamydomonas reinhardtii* (CC125).

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MICROALGAS

O interesse no cultivo de microalgas com aplicações industrial e acadêmica pode ser classificado como recente, e apresenta um relativo aumento no número de pesquisas e investimentos nas últimas décadas (CORREA *et al.*, 2017). Tais aplicações são em especial em relação ao potencial de produção de energias renováveis, assim como devido ao potencial de produção de produtos de elevado valor agregado. Tais interesses aliados com o potencial de conversão de poluentes e/ou dejetos apresentados por algumas espécies de microalgas, tornam de maior interesse a construção de processos que permitam o tratamento e resultem em produtos que sejam viáveis econômica e energeticamente (ZHU, 2015).

Para tanto a identificação adequada das espécies que propicie o conhecimento dos potenciais genéticos que determinada espécie pode alcançar pode ajudar a estabelecer um processo que seja viável energética e economicamente. A identificação da linhagem utilizada nos FBRs do NPDEAS (LGMM0001) iniciou com o isolamento de colônias a partir de uma amostra disponibilizada, através de técnicas de microbiologia. Colônias foram selecionadas por apresentarem inicialmente diferenças morfológicas, como coloração e contornos dos bordos das colônias, o que indicava a possibilidade da existência de diferentes morfotipos. Os isolados apresentaram características gerais compartilhadas pelos gêneros *Scenedesmus* e *Acutodesmus*, como células ovais ou cilíndricas com pólos obtusos ou truncados, sem espinhos, em coenobios planos ou ligeiramente curvos e parede celular lisa (KRIENITZ; BOCK, 2012), como apresentado na Figura 6. Devido à plasticidade morfológica apresentada por estes organismos (LÜRLING, 2003) um número significativo de espécies, descritas com base em características morfológicas, está em revisão.

Inúmeros autores realizaram estudos de identificação em nível de espécie utilizando o sequenciamento da região ITS para microalgas (AN *et al.*, 1999; TIMMINS *et al.*, 2009; HEGEWALD *et al.*, 2003, 2013; FERRIGO *et al.*, 2014). Apenas a região do ITS 2 já foi utilizada por Chen e colaboradores como barcode de DNA para plantas, sendo capaz de identificar amostras de diferentes famílias de grupos taxonômicos próximos (CHEN *et al.*, 2010). Chen e colaboradores concluíram, utilizando apenas a região do ITS2, que em 6.685 amostras contendo 4.800 espécies diferentes, as análises apresentaram porcentagens de identificação de 92,7% em nível de espécie e 99,8% em nível de gênero, mostrando assim alto grau de confiabilidade na utilização da região do ITS2 para estudos de análise filogenética.

As sequências da região ITS1, 5.8S, ITS2 e 729 pb, dos isolados, a análise apresentaram 100% de semelhança entre as sequências dos isolados e as sequências das espécies de *Scenedesmus rotundus* (AY510465.1) e *Acutodesmus obliquus* UTEX 72 (AJ249508.1) obtidas na base do GenBank. A linhagem UTEX 72 foi descrita pela primeira vez como *Scenedesmus obliquus* com base apenas em dados morfológicos, e após análises filogenéticas, foi proposto que esta linhagem fosse reclassificada no gênero *Acutodesmus* e espécies *A. obliquus* (HEGEWALD *et al.*, 2013). Assim sendo, as 4 linhagens iniciais foram identificadas como clones, e um clone foi depositado na coleção de cultura do Laboratório de Genética em Microrganismos da UFPR com o código LGMM0001 e a sequência depositada Genbank, KY436159. Desta forma, pode-se dizer que a região do ITS (ITS1, 5.8 e ITS2) apresenta eficácia na identificação molecular em nível de espécie para as amostras obtidas na etapa de isolamento e para espécies pertencentes ao gênero *Acutodesmus*, atualmente reconhecido como *Tetradismus*.

## 6.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS

A resistência aos antibióticos apresentada por inúmeras linhagens de patógenos clínicos, tem se apresentado como um grave e crescente problema para a saúde pública nas últimas décadas (BROKE, 2012; BONOMO *et al.*, 2016). Desta forma pesquisas e desenvolvimento de novos compostos que

apresentem atividade biológica frente a linhagens patogênicas, se apresentam como atrativas para processos novos e já estabelecidos de cultivos de microrganismo (STROBEL *et al.*, 2003; PAULUS *et al.*, 2017).

Durante o levantamento bibliográfico, não foi encontrado nenhum relato de trabalhos que apresentassem a exploração de metabólitos secundários provenientes de microalgas, da forma como foi realizado neste projeto. Tal interesse surgiu devido principalmente ao observar a baixa taxa de presença de bactérias durante o cultivo no FBRs existentes no NPDEAS, em comparação à concentração de células de microalgas. Este fato pareceu uma possível fonte de um novo co-produto, com potencial de alto valor agregado, justificando assim a pesquisa neste campo.

Para a produção dos metabólitos com atividade biológica, foram utilizados três meios de cultura, com diferentes fontes de nitrogênio e carbono, onde dois dos meios testados consistiam em meios de cultivo sintéticos (meio CHU e TAP) e o terceiro em meio de cultivo alternativo, o qual é utilizado em escala de engenharia nos FBRs.

Com relação ao rendimento de extratos obtidos pode-se observar, segundo os valores apresentados na TABELA 7 e a representação gráfica na FIGURA 14, que os rendimentos mássicos dos extratos obtidos também apresentaram diferença com relação ao meio de cultivo utilizado, assim como com a fase do cultivo utilizada para a obtenção dos extratos. Em comparação, os extratos obtidos a partir da biomassa de microalgas dos três meios de cultivos estudados apresentaram um maior rendimento em relação aos extratos obtidos a partir do cultivo residual, em destaque para os extratos obtidos a partir da biomassa microalgal do cultivo utilizando meio TAP.

Os testes de atividade biológica frente às linhagens de patógenos foi possível observar que os metabólitos secundários apresentaram perfil de atividade distintos, provavelmente devido a variação das fontes de carbono assim como das condições de cultivo em relação aos meios de cultivo sintéticos, condições de cultivo de temperatura e luminosidade controlados em relação ao meio alternativo com condição de temperatura e luminosidade

externos. Perfil este dentro do esperado quando falamos de metabólitos secundários e variações de cultivo (NETZKER *et al.*, 2015).

Através da comparação dos dados obtidos podemos observar que o meio alternativo de cultivo, o qual utiliza dejetos suíno como base de sua composição, apresentou os resultados mais significativos tanto em relação a biomassa quanto em relação ao cultivo residual frente a todas as 10 (dez) linhagens de patógenos clínicos estudados. Frente as linhagens patogênicas existentes no grupo utilizado, a análise do resultado foi realizada comparando os resultados entre apenas as bactérias gram-negativas e apenas entre as bactérias gram positivas. Os resultados mais significativos frente as bactérias gram-positivas foram apresentadas pelo extrato obtido a partir do cultivo residual com meio alternativo, enquanto frente as bactérias gram-negativas foram apresentadas pelo extrato obtido a partir da biomassa com meio alternativo (FIGURA 17). Mostrando mais uma vez que os extratos obtidos a partir do cultivo realizado nos FBR's são superiores aos resultados obtidos a partir do cultivo nos meios sintéticos utilizados.

Dentre todas as dez linhagens pesquisadas, a inibição de crescimento da bactéria gram positiva *S. aureus* (sensível e resistente a metilicina), foi a que apresentou as melhores respostas. Sendo o melhor resultado obtido pelos extratos produzidos a partir do cultivo em meio alternativo com a etapa do cultivo residual, os valores de inibição dos halos variaram de 7,58 a 13,87 mm. O extrato obtido a partir deste meio de cultivo e desta fase do cultivo mostrou resultado considerável de inibição das linhagens, *C. albicans*, *S. maltophilia* e *E. faecalis*. Assim sendo, considerando a dificuldade no tratamento de infecções causadas por estas linhagens patogênicas, os resultados obtidos se apresentam relevantes e estudos para a identificação dos compostos causadores da inibição do crescimento são importantes.

Nas últimas décadas o desenvolvimento e a propagação da resistência à antibióticos entre linhagens de microrganismos patogênicos, tem se mostrado um problema crescente e em escala mundial para a saúde pública. Algumas espécies de patógenos apresentam resistência intrínseca a antibióticos e assim

sendo, são também associados a infecções que são responsáveis por grandes custos na saúde pública (BROKE, 2012; BONOMO *et al.*, 2016).

Os resultados mostram o potencial na investigação dos metabólitos secundários produzidos pela linhagem de microalga *T. obliquus* (= *A. obliquus*) (LGMM0001), devido a elevada atividade biológica observada. Este é o primeiro relato de atividade biológica, apartir de extratos produzidos por esta espécie de microalga, sendo que a linhagem (LGMM0001) apresentou atividade moderada contra as linhagens de patógenos clínicos.

### 6.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA DOS EXTRATOS

O extrato testado para atividade larvicida escolhido foi o que apresentou os melhores valores de rendimentos mássicos, além de resultados expressivos com relação a atividade contra linhagens patogênicas. Os resultados do teste de atividade larvicida dos extratos mostram que a mortalidade de larvas dos mosquitos de *A. aegypti* na concentração de 500 ppm foi de  $\geq 32\%$ , porcentagem essa menor dos que as observadas em experimentos realizado por Manilal e colaboradores (MANILAL *et al.*, 2011).

Os resultados observados não mostram uma atividade larvicida de grande potencial quando comparada aos resultados já publicados (RAO *et al.*, 1999; MANILAL *et al.*, 2011), já que o valor de dose letal necessária para eliminar metade de uma população ( $LC_{50} = 632$  ppm) é muito superior. Em adição, apesar dos resultados poucos animadores o extrato testado apresentou algum poder larvicida, que deve ser melhor explorado através de teste complementares como extratos a partir de outros solventes, além de testes que mostrem que a aplicação do extrato não resulte em inibição do mosquito fêmea em depositar ovos. Assim sendo, é importante levar em conta e determinar se o extrato proveniente da linhagem de microalga em questão (LGMM0001) é determinante para repelir o mosquito fêmea na deposição de ovos, que resultarão em larvas e por fim em novos mosquitos (BIANCO *et al.*, 2013).

#### 6.4. PRODUÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE HIDROGÊNIO

O hidrogênio é uma das fontes de energia limpa com maior grau de eficiência energética e sustentável, quando originado de fonte renováveis, que pode ser usado em complemento ou substituição aos combustíveis de origem fóssil (AZIZ, 2016. HOSSEINI & WAHID, 2016). Com relação a aplicação do gás hidrogênio, está ocorre nos mais diversos segmentos desde de geração de energia elétrica até como células de combustível, incluindo aplicações em processos industriais. Porém, o alto custo de produção, assim como os desafios de logística e armazenamento, resultam em uma viabilidade econômica desafiadora para o uso do hidrogênio como fonte de combustível (CHU & MAJUMDAR, 2012. RASHID *et al.*, 2013. OEY *et al.*, 2016). Com relação ao método de obtenção de hidrogênio, existem muitos processos para a produção, como por exemplo, eletrólise, fotólise ou via ação de microrganismos (HOLLADAY *et al.*, 2009. OBRADOVIC *et al.*, 2013. YILMAZ *et al.*, 2016). Entretanto os processos de produção termoquímicos e eletroquímicos apresentam altos índices de gasto energético elevando os custos de produção além do impacto ambiental que estes processos produtivos causam. Desta forma, a produção de hidrogênio por vias biológicas se mostra como uma abordagem potencialmente eficiente, ambientalmente amigável e com menos aplicações energéticas quando comparada aos outros métodos (DEBABRATA & VEZIROGLU, 2001. KHETKORN *et al.*, 2013. NYBERG *et al.*, 2015).

Como já se sabe, o potencial da produção de hidrogênio em microalgas verdes é diretamente relacionado e dependente da capacidade específica de determinada linhagem em expressar enzimas responsáveis pelo metabolismo do hidrogênio, assim como as condições de cultivo que favoreçam a expressão destas proteínas funcionais (KHETKORN *et al.*, 2013. NYBERG *et al.*, 2015). A utilização de microalgas para produção de hidrogênio pode ocorrer da forma bioquímica ou termoquímica, onde a segunda ainda apresenta vantagens com relação a rendimento, quando comparada com a primeira, e faz uso da biomassa microalgal nos processos de gaseificação e pirólise, enquanto que a forma bioquímica de produção utiliza metabolismo das próprias linhagens

ou ainda se faz uso da biomassa microalgal em processo fermentativo (AZIZ *et al.*, 2015).

Nesta dissertação teve-se por objetivo identificar e quantificar a produção de hidrogênio pela linhagem nativa, molecularmente identificada, cultivada nos FBR's do NPDEAS. A aplicação da metodologia proposta foi aplicada juntamente com uma linhagem de controle adquirida no *Chlamydomonas Resource Center*, pelo grupo de pesquisa, devido à capacidade de produção de gás hidrogênio. Assim sendo, ambas as linhagens utilizadas, a nativa de *T. obliquus* (= *A. obliquus*) (LGMM0001), e a linhagem controle *C. reinhardtii* (CC-125), apresentaram resposta positiva para a formação do gás hidrogênio de interesse, e o sistema de aquisição de dados foi capaz de registrar os dados para construção da curva média de produção, apresentada na FIGURA 21.

A média dos valores, das duplicatas, mostra que a curva desenhada com os valores obtidos pela linhagem de *T. obliquus* (= *A. obliquus*) (LGMM0001), apresentou um comportamento bastante instável, quando comparado com o comportamento mais regular observado pela linhagem controle (*C. reinhardtii* - CC-125). Pode-se observar que a metodologia aplicada foi bem-sucedida, porém ajustes são necessários, visto a influência apresentada nos valores obtidos no experimento da linhagem controle. Com relação a linhagem utilizada nos FBR's do NPDEAS, pode-se observar que é necessária a adaptação do cultivo de inóculo para que este apresente um maior número de células, para que resulte posteriormente em maiores índices de produção de hidrogênio. Porém, para comprovar tamanha influência do número de células presentes, sugere-se maiores desenhos experimentais.



## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metodologia do trabalho desenvolvido envolveu técnicas de isolamento e identificação morfológica e molecular de microrganismos. Estas técnicas resultaram na identificação da linhagem utilizada nos FBR's do NPDEAS. A linhagem de microalga isolada foi avaliada quanto a capacidade de produzir co-produtos que possam auxiliar na viabilidade econômica e energética na produção em larga escala da biomassa microalgal. Assim sendo, foi possível comprovar que a linhagem em questão foi capaz de produzir hidrogênio, bem como apresentou atividade biológica dos extratos obtidos a partir das fases de cultivo. Em conclusão, a linhagem de microalga utilizada neste trabalho foi caracterizada como *Tetrademus obliquus* (=A. *obliquus*), e foi capaz de produzir compostos com potencial econômico em associação com o processo de produção de biocombustíveis.

### 7.1. CONCLUSÕES

As principais conclusões desta dissertação são:

- O isolamento e identificação da principal linhagem de microalga utilizada nos FBRs do NPDEAS foram realizados e a linhagem identificada como *Tetrademus obliquus* (=A. *obliquus*) com base em dados morfológicos e molecular. Este resultado mostra a importância em aliar metodologias moleculares com morfológicas para a identificação adequada de linhagens, auxiliando para os primeiros passos de trabalhos que envolvem a engenharia genética de linhagem selvagens. Além de mostrar divergências na taxonomia das microalgas que ainda sofrem modificações nas nomenclaturas aplicadas.
- A avaliação de atividade biológica dos extratos produzidos pela linhagem isolada foi verificada quanto a atividade antibacteriana frente a dez linhagens de bactérias multirresistentes e a atividade larvicida frente a larvas da linhagem Rockefeller do mosquito *Aedes aegypti*, portador do vírus causador da febre da dengue. Tais avaliações apresentaram resultados positivos para

ambos os testes realizados, os quais colaboram potencialmente para combater os malefícios causados pelas linhagens patogênicas pesquisadas.

- O desenvolvimento de processo de produção e quantificação de hidrogênio formado pela linhagem isolada foi comprovado com a metodologia aplicada, pois foi possível mensurar a produção de hidrogênio pela linhagem isolada. Desta forma foi possível comprovar que o processo de biofotólise indireta apresenta potencial para produção de hidrogênio em escala maiores, como por exemplo de FBR de 12.000 litros, o que pode auxiliar na viabilidade econômica de uma estrutura de biorrefinaria como a desenvolvida no NPDEAS.

## 7.2. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Recomenda-se para trabalhos futuros os seguintes pontos não tratados no presente trabalho e pouco abordados pela literatura:

- Recomenda-se que um fracionamento dos extratos obtidos deva ser realizado para que ocorra a identificação dos compostos responsáveis pela ação antimicrobiana, assim como investiga a toxicidade destes compostos, para que a viabilidade dos extratos possa ser melhor comprovada como agente antipatógenos;
  - Para a ação larvicida recomenda-se que outros solventes sejam testados para a produção de extratos, assim como testes relacionados a ação repelente desses extratos obtidos;
  - Realizar maiores experimentos quanto a produção de hidrogênio pela linhagem isolada, objetivando o melhor conhecimento do ciclo de produção do gás de interesse. Pesquisas com relação ao ciclo anaeróbico nos fotobiorreatores são necessárias, assim como para a aquisição, ajuste e validação da produção de hidrogênio em escalas superior à de bancada; e
  - Por fim, recomenda-se realizar análise de viabilidade econômica e energética da produção hidrogênio em fotobiorreatores aliada a extração de metabólitos secundários, levando em conta a eficiência final dos produtos, os custos de produção, assim como de armazenamento e transporte do gás hidrogênio.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÁCS, Norbert. BAGI, Zoltán. RÁKHELY, Gábor. MINÁROVICS, János. NAGY, Katalin. KOVÁCS, Kornél L. **Bioaugmentation of biogas production by a hydrogen-producing bacterium**. Bioresource Technology. Volume 186. p286 – 293. 2015.

ADEGBOYE, M. F. BABALOLA, O. O. Actinomycetes: a yet inexhaustive source of bioactive secondary metabolites. **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education**.V. 2. p.786–795. 2013.

AMARO, Helena M. GUEDES, A. Catarina, MALCATA, F. Xavier. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied Energy**.V. 88. p.3402–3410. 2011.

AN, S. S. FRIEDEL, T. HEGEWALD, E. Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Scenedesmus*-like coccoid green algae as inferred from ITS-2 rDNA sequence comparison. **Plant Biology**, V. 1, p.418–428, 1999.

ANH, Le T. REKSOWARDOJO, I. K. WATTANAVICHIE, K. **Utilisation of Biofuels in Diesel Engines**. Handbook of Biofuels Production. Capítulo 23. p.611-646. 2011.

ANILA, N. CHANDRASHEKAR, Arun. RAVISHANKAR, G.A. SARADA, R. Establishment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation in *Dunaliella bardawil*. **European Journal of Phycology**. V. 46. p.36-44. 2011.

AZIZ, Muhammad. PRAWISUDHA, Pandji. PRABOWO, Bayu. BUDIMAN, Bentang Arief. Integration of energy-efficient empty fruit bunch drying with gasification combined cycle systems. **Applied Energy**. V. 139. p.188-95. 2015.

AZIZ, Muhammad. Integrated hydrogen production and power generation from microalgae. **International Journal of Hydrogen Energy**. V. 41, p.104–112. 2016

BADAMCHI, Ali. MASOUMI, Hossein. JAVADINIA, Shima. ASGARIAN, Ramin. TABATABAEE, Azardokht. Molecular detection of six virulence genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates detected in children with urinary tract infection. **Microbial Pathogenesis**. V. 107. p.44-47.

BECKER, E.W. **Microalgae: Biotechnology and Microbiology**. Cambridge University Press. 1994.

BIANCO, Everson M. PIRES, Luana. SANTOS, Geanne K. N. DUTRA, Kamilla A. REIS, Thiago N.V. VASCONCELOS, Edson R. T. P. P. COCENTINO, Adilma L.M. NAVARRO, Daniela M.A.F. Larvicidal activity of seaweeds from northeastern Brazil and of a halogenated sesquiterpene against the dengue

mosquito (*Aedes aegypti*). **Industrial Crops and Products**. V.43. p.270-275. 2013.

BLUNT, J. W. COPP, B. R. MUNRO, M. H. G. NORTHCOTE, P. T. PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Nat. Prod. Rep.** V. 28. p.196–268. 2011.

BONOMO, R. A. SZABO, D. Mechanisms of Multidrug Resistance in *Acinetobacter* Species and *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Infectious Diseases - CDI** 2006: 43. 2016.

BOROWITZKA, Michael A. High-value products from microalgae—their development and commercialization. **Journal of Applied Phycology**. V. 25. p.743-756. 2013.

BRAKHAGE, A. A. Regulation of fungal secondary metabolism. **Nature Reviews Microbiology**. V. 11, p.21–32. 2013.

BRENNAN, Liam. OWENDE, Philip. Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. V. 14. p.557-577. 2010.

BROOKE, J. S. *Stenotrophomonas maltophilia*: an Emerging Global Opportunistic Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**. V.25. n.1. p.2 – 41, 2012.

BROWN, L. E. SPRECHER, S. L. KELLER, L. R. Introduction of Exogenous DNA into *Chlamydomonas reinhardtii* by Electroporation. **Molecular and Cellular Biology**. V. 11. p.2328-2332. 1991.

CABRITA, M. T. VALE, C. RAUTER, A. P. Halogenated compounds from marine algae. **Mar. Drugs**. V. 8. p.2301–2317. 2010.

CAMPOS, Anaelís C. ALBIERO, James. ECKER, Alessandra B. KURODA, Cristina M. MEIRELLES, Lívia E.F. POLATO, Angelita. TOGNIM, Maria C.B. WINGETER, Márcia A. TEIXEIRA, Jorge J.V. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K pneumoniae*: A systematic review. **American Journal of Infection Control**. V. 44. p.1374-1380. 2016.

CANAKCI, M. VAN GERPEN, J. Biodiesel production via acid catalysis. **Transactions of the American Society of Agricultural Enginee**. V. 42. p.1203-1210. 1999.

CANAKCI, Mustafa. The potential of restaurant waste lipids as biodiesel feedstocks. **Bioresource Technology**. V. 98. p.183-190. 2007.

CHAKOTIYA, Ankita Singh. TANWAR, Ankit. NARULA, Alka. SHARMA, Rakesh Kumar. *Zingiber officinale*: Its antibacterial activity on *Pseudomonas aeruginosa* and mode of action evaluated by flow cytometry. **Microbial Pathogenesis**. V. 107. p.254-260. 2017.

CHASNYK, Olena. SOLWSKI, G. SHKARUPA, O. Historical, technical and economic aspects of biogas development: Case of Poland and Ukraine. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. V. 52. p.227-239. 2015

CHEN, Haojun. LIU, Qianqian. CHEN, Zhanguo. LI, Congrong. Efficacy of sulbactam for the treatment of *Acinetobacter baumannii* complex infection: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Infection and Chemotherapy**. V. 23. p.278-285. 2017.

CHEN, S.; YAO, H.; HAN, J.; LIU, C.; SONG, J.; SHI, J. L.; ZHU, Y.; MA, X.; GAO, T.; PANG, X.; LUO, K.; LI, Y.; LI, X.; JIA, X.; LIN, Y.; LEON, C. Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. **Plos One**. v.5, n.1, p. 8313, 2010.

CHEW, Kit Wayne. YAP, Jing Ying. SHOW, Pau Loke. SUAN, Ng Hui. JUAN, Joon Ching. LING, Tau Chuan. LEE, Duu-Jong. CHANG, Jo-Shu. Microalgae biorefinery: High value products perspectives. **Bioresource Technology**. V. 229. p.53–62. 2017

CHOKSHI, Kaumeel. PANCHAL, Imran. TRIVEDI, Khanjan. GEORGE, Basil. MAURYA, Rahul Kumar. GHOSH, Arup. MISHRA, Sandhya. Biofuel potential of the newly isolated microalgae *Acutodesmus dimorphus* under temperature induced oxidative stress conditions. **Bioresource Technology**. V. 180. p.162–171. 2015.

CHU, S. P. The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae. **Journal of Ecology**, V. 30, p.284-325. 1942.

CHU, Steven. MAJUMDAR, Arun. Opportunities and challenges for a sustainable energy future. **Nature**. V. 488, p.294–303. 2012.

CORREA, Diego. SANTOS, Beatriz. DIAS, Fernando G. VARGAS, Jose. MARIANO, Andre. BALMANT, Wellington. ROSA, Marcos. SAVI, Daiani. KAVA, Vanessa. GLIENKE, Chirlei. ORDONEZ, Juan. Enhanced biohydrogen production from microalgae by diesel engine hazardous emissions fixation. **International Journal of Hydrogen Energy**. V. 42. n.33. p.21463-21475. 2017.

CORLOUER, C. LAMY, B. DESROCHES, M. RAMOS-VIVAS, J. MEHIRI-ZGHAL, E. LEMENAND, O. DELARBRE, J-M. DECOUSSER, J-W. *Stenotrophomonas maltophilia* healthcare-associated infections: identification of two main pathogenic genetic backgrounds. **Journal of Hospital Infection**. p.1-6. 2017.

DASGUPTA, Chitrallekha Nag. SUSEELA, M. R. MANDOTRA, S. K. KUMAR, Pankaj. PANDEY, Manish K. TOPPO, Kiran. LONE, J. A. Dual uses of microalgal biomass: An integrative approach for biohydrogen and biodiesel production. **Applied Energy**. V. 146. p.202-208. 2015.

DAUTOR, Yasmeen. ÚBEDA-MÍNGUEZ, Patricia. CHILEK, Tarik. GARCÍA-MAROTO, Federico. ALONSO, Diego López. Development of genetic transformation methodologies for an industrially-promising microalga: *Scenedesmus almeriensis*. **Biotechnology Letters**. V. 36. p.2551-2558. 2014.

DEBABRATA, Das. VEZIROGLU, T. Nejat. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. **International Journal of Hydrogen Energy**. V. 26. p.13–28. 2001.

DE VITA, Daniela. SIMONETTI, Giovanna. PANDOLF, Fabiana. COSTI, Roberta. DI SANTO, Roberto. D'AURIA, Felicia Diodata. SCIPIONE, Luigi. Exploring the anti-biofilm activity of cinnamic acid derivatives in *Candida albicans*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. V. 26. p.5931–5935. 2016.

DEMIRBAS, Ayhan. Progress and recent trends in biodiesel fuels. **Energy Conversion and Management**. V. 50. p.14-34. 2009.

DEREDJIAN, Amélie. ALLIOT, Nolwenn. BLANCHARD, Laurine. BROTHIER, Elisabeth. ANANE, Makram. CAMBIER, Philippe. JOLIVET, Claudy. KHELIL, Mohamed Naceur. NAZARET, Sylvie. SABY, Nicolas. THIOULOUSE, Jean. FAVRE-BONTE, Sabine. Occurrence of *Stenotrophomonas maltophilia* in agricultural soils and antibiotic resistance properties. **Research in Microbiology**. V. 167. p.313-324. 2016.

DIAS, Fernando Gallego. **Modelagem, Ajuste e Validação Experimental do Processo de Geração de Hidrogênio via Cultivo de Microalgas em Fotobiorreatores Compactos**. 118f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciências dos Materiais), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

EBENEZER, Vinitha. MEDLIN, Linda K. KI, Jang-Seu. Molecular detection, quantification, and diversity evaluation of microalgae. **Marine Biotechnology** 2012;14: 129-42.

ENDE, Gerrits Van Den. A. H. G. HOOG, G. S. De. Variability and molecular diagnostics of the neurotropic species *Cladophialophora bantiana*. **Studies in Mycology**. V. 43. p.151-162. 1999.

EROGLU, E. MELIS, A. Microalgal hydrogen production research. **International Journal Hydrogen Energy**. V. 41. p.12772–12798. 2016

FERRIGO, Davide. GALLA, Giulio. SFORZA, Eleonora. MOROSINOTTO, Tomas. BARCACCIA, Gianni. BERRINI, Cristina Ceschi. Biochemical characterization and genetic identity of an oil-rich *Acutodesmus obliquus* isolate. **Journal of Applied Phycology**. V.27, n. 1, p.149-161, 2015.

FLYNN, K. J. MITRA, A. GREENWELL, H. C. SUI, J. Monster potential meets potential monster: pros and cons of deploying genetically modified microalgae for biofuels production. **The Royal Society**. V. 3. p.1-11. 2013.

GERARDO, Michael L. OATLEY-RADCLIFFE, Darren L. LOVITT, Robert W. Integration of membrane technology in microalgae biorefineries. **Journal of Membrane Science**. V. 464. p.86-99. 2015.

GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G. DE HOOG, G. S. Variability and molecular diagnostics of the neurotropic species *Cladophialophora bantiana*. **Studies in Mycology**. V. 43. p.151-162. 1999.

GHIRARDI, M. L. Implementation of photobiological H<sub>2</sub> production: the O<sub>2</sub> sensitivity of hydrogenases. **Photosynthesis Research**. V. 125, p.383–393. 2015

GUARNIERI, Michael T. NAG, Ambarish. SMOLINSKI, Sharon L. DARZINS ,Al. SEIBERT, Michael. PIENKOS, Philip T. Examination of Triacylglycerol Biosynthetic Pathways via De Novo Transcriptomic and Proteomic Analyses in an Unsequenced Microalga. **PLoS ONE**. V. 6. p.1-13. 2011

GÜNERKEN, E. D'HONDT, E. EPPINK, M. H. M. GARCIA-GONZALEZ, L. ELST, K. WIJFFELS, R.H. Cell disruption for microalgae biorefineries. **Biotechnology Advances**. V. 33. p.243-260. 2015.

GUO, Hui. DAROCH, Maurycy. LIU, Lei. QIU, Guoyu. GENG, Shu. WANG, Guangyi. Biochemical features and bioethanol production of microalgae from coastal waters of Pearl River Delta. **Bioresource Technology**. V. 127. p.422 – 428. 2013.

GUO, Suo-Lian. ZHAO, Xin-Qing. TANG, Ying. WAN, Chun. ALAM, Md. Asraful. HO, Shih-Hsin. BAI, Feng-Wu. CHANG, Jo-Shu. Establishment of an efficient genetic transformation system in *Scenedesmus obliquus*. **Journal of Biotechnology**. N° 163. p.61–68. 2013

HALL, John D. FUCÍKOVÁ, Karolina. LO, Chien. LEWIS, Louise A. KAROL, Kenneth G. An assessment of proposed DNA barcodes in freshwater green algae. **Cryptogamie, Algologie**. V. 3. p.529-555. 2010.

HE, S. FAN, X. LUO, S. KATUKURI, N. R. GUO, R. Enhanced the energy outcomes from microalgal biomass by the novel biopretreatment. **Energy Convers Manage**. V. 135. p.291–296. 2017.

HEGDE, Krishnamoorthy. CHANDRA, Niharika. SARMA, Saurabh Jyoti. BRAR, Satinder Kaur. VEERANKIL, Venkata Dasu. Genetic Engineering Strategies for Enhanced Biodiesel Production. **Molecular Biotechnology**. V. 57. p.606-624. 2015.

HEGEWALD, E.; WOLF, M. Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Acutodesmus* (*Chlorophyta*, *Chlorophyceae*) as inferred from 18S rDNA and ITS-2 sequence comparisons. **Plant Systematics and Evolution**. V. 241. n. 3-4, p.185–191, 2003.

HEGEWALD, Eberhard. BOCK, Christina. KRIENITZ, Lothar. A phylogenetic

study on *Scenedesmaceae* with the description of a new species of *Pectinodesmus* and the new genera *Verrucodesmus* and *Chodatodesmus* (*Chlorophyta*, *Chlorophyceae*). **Fottea, Olomouc**. V. 13. p.149-164. 2013

HEMSCHEMEIER, Anja. MELIS, Anastasios. HAPPE, Thomas. Analytical approaches to photobiological hydrogen production in unicellular green algae. **Photosynthesis Research**. V. 102. p.523-540. 2009.

HO, Shih-Hsin. HUANG, Shu-Wen. CHEN, Chun-Yen. HASUNUMA, Tomohisa. KONDO, Akihiko. CHANG, Jo-Shu. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. **Bioresource Technology**. V. 135. p.191-198. 2013.

HOLLADAY, J. D. HU, J. KING, D. L. Wang, Y. An overview of hydrogen production technologies. **Catalysis Today**. V. 139. p.244–260. 2009.

HONG, J. W. JO, S. W. YOON, H. S. Research and development for algae-based technologies in Korea: a review of algae biofuel production. **Photosynthesis Research**. V. 123. p.297-303. 2015.

HOSSEINI, Seyed Ehsan. WAHID, Mazlan Abdul. Hydrogen production from renewable and sustainable energy resources: promising green energy carrier for clean development. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. V. 57, p.850–866. 2016

HWANG, J-H. KABRA, A. N. KIM, J. R. JEON, B-H. Photoheterotrophic microalgal hydrogen production using acetate- and butyrate-rich wastewater effluent. **Energy**. V. 78. p.887-94. 2014

HWANHLEM, Noraphat. IVANOVA, Teodora. BISCOLA, Vanessa. CHOISET, Yvan. HAERTL, Thomas. Bacteriocin producing *Enterococcus faecalis* isolated from chicken gastrointestinal tract originating from Phitsanulok, Thailand: Isolation, screening, safety evaluation and probiotic properties. **Food Control**. V. 78. p.187-195. 2017.

IRINYI, Laszlo. LACKNER, Michaela. DE HOOG, G. Sybren. MEYER, Wieland. DNA barcoding of fungi causing infections in humans and animals. **Fungal Biology**. V. 120. p.125–136. 2016

JOHN, R.P. ANISHA, G.S. NAMPOOTHIRI, K.M. PANDEY, A. Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**. V. 102. p.186-193. 2011.

KHETKORN, Wanthanee. KHANNA, Namita. INCHAROENSAKDI, Aran. LINDBLAD, Peter. Metabolic and genetic engineering of cyanobacteria for enhanced hydrogen production. **Biofuels**. V. 4 p.535–561. 2013

KILIAN, Oliver. BENEMANNA, Christina S. E. NIYOGI, Krishna K. VICK, Bertrand. High-efficiency homologous recombination in the oil-producing alga *Nannochloropsis* sp. **Proceedings of the National Academy of Sciences of**



**the United States of America.** V. 108. p.21265 – 21269. 2011.

KIM, M. M. MENDIS, E. KIM, S. K. *Laurencia okamurai* extract containing laurinterol induces apoptosis in melanoma cells. **J. Med. Food.** V. 11. p.260–266. 2008.

KOKOSSIS, A.C. TSAKALOVA, M. PYRG, K. Design of integrated biorefineries. **Computers and Chemical Engineering.** V. 81. p.40–56. 2015

KOSOUIROV, Sergey. PATRUSHEVA, Elena. GHIRARDI, Maria L. SEIBERT, Michael. TSYGANKOV, Anatoly. A comparison of hydrogen photoproduction by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under different growth conditions. **Journal of Biotechnology.** V. 128. p.776-787. 2007.

KRIENITZ, Lothar. BOCK, Christina. Present state of the systematics of planktonic coccoid green algae of inland waters. **Phytoplankton Review Paper.** V. 698. p.295-326. 2012.

LAMBERTZ, C. LEIDEL, N. HAVELIUS, K. G. V. NOTH, J. CHERNEV, P. WINKLERS, M. HAPPE, T. HAUMANN, M. O<sub>2</sub> reactions at the six-iron active site (H-cluster) in [FeFe]-hydrogenase. **Journal of Biological Chemistry.** V. 286, p.40614–40623. 2011.

LARKUM, Anthony W. D. ROSS, Ian L. KRUSE, Olaf. HANKAMER, Ben. Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production. **Trends in Biotechnology.** V. 30. p.198-205. 2012.

LAURINAVICHENE, Tatyana V. TOLSTYGINA, Irena V. GALIULINA, Rumiya R. GHIRARDI, Maria L. SEIBERT, Michael. TSYGANKOV, Anatoly A. Dilution methods to deprive *Chlamydomonas reinhardtii* cultures of sulfur for subsequent hydrogen photoproduction. **International Journal of Hydrogen Energy.** V. 27. p.1245-1249. 2002.

LEITE, Gustavo B. ABDELAZIZ, Ahmed E.M. HALLENBECK, Patrick C. Algal biofuels: Challenges and opportunities. **Bioresource Technology.** V. 145. p.134-141. 2013.

LEWIS, Louise A. MCCOURT, Richard M. Green Algae and the Origin of Land Plants. **American Journal of Botany.** V. 91. p.1535–1556. 2004.

LI, Qiang. DU, Wei. LIU, Dehua. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. **Appl Microbiol Biotechnol.** V. 80. p.749 – 756. 2008.

LI, Ling. CUI, Jing. LIU, Qian. DING, Yancong. LIU, Jianguo. Screening and phylogenetic analysis of lipid-rich microalgae. **Algal Research.** V. 11. P.381–386 2015.

LIANG, Yanna. KASHDAN, Tyler. STERNER, Christy. DOMBROWSKI, Lilli. PETRICK, Ingolf. KRÖGER, Michael. HÖFER, Rainer. Algal Biorefineries. Capítulo 2. **Industrial Biorefineries & White Biotechnology.** p.35-90. 2015.

LIMA, E. P. OLIVEIRA FILHO, A. M. LIMA, J. W. O. RAMOS-JÚNIOR, A. N. CAVALCANTI, L. P. G. PONTES, R. J. S. Resistência do *Aedes aegypti* ao temefós em municípios do Estado do Ceará. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** V 39. p.259–263. 2006.

LIU, Chien-Hung. CHANG, Chin-Yen. LIAO, Qiang. ZHU, Xun. LIAO, Ching-Fu. CHANG, Jo-Shu. Biohydrogen production by a novel integration of dark fermentation and mixotrophic microalgae cultivation. **International Journal of Hydrogen Energy**. V. 38. p.15807-15814. 2013.

LÜRLING, Miquel. Phenotypic plasticity in the green algae *Desmodesmus* and *Scenedesmus* with special reference to the induction of defensive morphology. **Annales de Limnologie - International Journal of Limnology**. N° 39. 2003.

MANILAL, Aseer. THAJUDDIN, Nooruddin. SELVIN, Joseph. IDHAYADHULLA, Akbar. KUMAR, Radhakrishnan Surendra. SUJITH, Sugathan. In vitro mosquito larvicidal activity of marine algae against the human vectors, *Culex quinquefasciatus* (Say) and *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae). **International Journal of Zoological Research**. V. 7, p.272–278. 2011.

MATSUNAGA, Tadashi. TAKEYAMA, Haruko. Genetic-Engineering in Marine Cyanobacteria. **Journal of Applied Phycology**. V. 7. p.77-84. 1995.

MAYER, A. M. S. HAMANN, M. T. Marine pharmacology in 2000: marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antituberculosis and antiviral activities; affecting the cardio-vascular, immune and nervous system and other miscellaneous mechanisms of action. **Mar Biotechnol**. V. 6. p.37–52. 2004.

MCMICKEN, Elizabeth. MRSA Transmission in the Neonatal Intensive Care Unit. **Journal of Neonatal Nursing**. V. 23, p.99-102. 2017.

MELIS, Anastasios. HAPPE, Thomas. Hydrogen production. Green algae as a source of energy. **Plant Physiol**. V. 127. p.740-748. 2001

MELIS, Anastasios. ZHANG, Liping. FORESTIER, Marc. GHIRARDI, Maria L. SEIBERT, Michael. Sustained Photobiological Hydrogen Gas Production upon Reversible Inactivation of Oxygen Evolution in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Physiology**. V. 122. p.127-135. 2000.

MELO-SANTOS, M. A. V. VARJAL-MELO, J. J. M. ARAÚJO, A. P. PAIVA, M. H. S. REGIS, L. M. FURTADO, A. L. MAGALHÃES, T. MACORIS, M. L. G. ANDRIGHETTI, M. T. M. AYRES, C. F. J. Resistance to the organophosphate temephos: mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. **Acta Trop**. V. 113. p.180–189. 2010.

MIAO, Jian. CHEN, Lequn. WANG, Jingwen. WANG, Wenxin. CHEN, Dingqiang. LI, Lin. LI, Bing. DENG, Yang. XU, Zhenbo. Current methodologies

on genotyping for nosocomial pathogen methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Microbial Pathogenesis**. V. 107. p.17-28. 2017.

MIYAGAWA-YAMAGUCHI, Arisa. OKAMI, Takuma. KIRA, Nozomu. YAMAGUCHI, Haruo. OHNISHI, Kouhei. ADACHI, Masao. Stable nuclear transformation of the diatom *Chaetoceros* sp. **Phycological Research**. V. 59. p.113-119. 2011.

MURAKAMI, Keiji. ONO, Tsuneko. NOMA, Yasuki. MINASE, Issei. AMOH, Takashi. IRIE, Yasuhiko. HIROTA, Katsuhiko. MIYAKE, Yoichiro. Explorative gene analysis of antibiotic tolerance-related genes in adherent and biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Infection and Chemotherapy**. V. 23. p.271-277. 2017.

MURPHY, Denis J. Molecular breeding strategies for the modification of lipid composition. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**. V. 42. p.89 – 99. 2006.

NAGARAJAN, D. LEE, D.-J. KONDO, A. CHANG, J.-S. Recent insights into biohydrogen production by microalgae – from biophotolysis to dark fermentation. **Bioresour Technol**. V. 227. p.373–387. 2017

NETZKER, T. FISCHER, J. WEBER, J. MATTERN, D. J. KÖNIG, C. C. VALIANTE, V. SCHROECKH, V. BRAKHAGE, A. A. Microbial Communication Leading to the Activation of Silent Fungal Secondary Metabolite Gene Clusters. **Frontiers in Microbiology**. V.6, p.1–13, 2015.

NEVES-FILHO, R. A. W. SILVA, C. A. SILVA, C. S. B. NAVARRO, D. M. A. F. SANTOS, F. A. B. ALVES, L. C. CAVALCANTI, M. G. S. SRIVASTAVA, R. M. CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G. Improved microwave-mediated synthesis of 3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl) propionic acids and their larvicidal and fungal growth inhibitory properties. **Chem. Pharm. Bull**. V. 57, p.819–825. 2009.

NIU, Y. F. ZHANG, M. H. XIE, W. H. LI, J. N. GAO, Y. F. YANG, W. D. LIU, J. S. LI, H. Y. A new inducible expression system in a transformed green alga, *Chlorella vulgaris*. **Genetics and Molecular Research**. V. 10. p.3427-3434. 2011.

NYBERG, Marcus. HEIDORN, Thorsten. LINDBLAD, Peter. Hydrogen production by the engineered cyanobacterial strain Nostoc PCC 7120  $\Delta$ hupW examined in a flat panel photobioreactor system. **Journal of Biotechnology**. V 215. p.35–43. 2015.

OBRADOVIC, Ana. LIKOZAR, Blaz. LEVEC, Janez. Catalytic surface development of novel nickel plate catalyst with combined thermally annealed platinum and alumina coatings for steam methane reforming. **International Journal of Hydrogen Energy**. V. 38. p.1419–1429. 2013.

OHEY, M. SAWYER, A. L. ROSS, I. L. HANKAMER, B. Challenges and opportunities for hydrogen production from microalgae. **Plant Biotechnology**

**Journal**. V. 14. p.1487–1499. 2016.

PARMAR, Asha. SINGH, Niraj Kumar. PANDEY, Ashok. GNANSOUNOU, Edgard. MADAMWAR, Datta. Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. **Bioresource Technology**. V. 102. p.10163-10172. 2011.

PERUMAL, Venkatesh. VENKATESAN, Arul. Antimicrobial, cytotoxic effect and purification of bacteriocin from vancomycin susceptible *Enterococcus faecalis* and its safety evaluation for probiotization. **LWT - Food Science and Technology**. V. 78. p.303-310. 2017.

PFEIFFER, Anne. KUNKEL, Tim. HILTBRUNNER, Andreas. NEUHAUS, Gunther. WOLF, Iris. SPETH, Volker. ADAM, Eva. NAGY, Ferenc. SCHÄFER, Eberhard. A cell-free system for light-dependent nuclear import of phytochrome. **The Plant Journal**. V. 57. p.680-689. 2009.

PHUKAN, Mayur M. CHUTIA, Rahul S. KONWAR, B.K. KATAKI, R. Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock. **Applied Energy**. V. 88. p.3307-3312. 2011

POTVIN, Gabriel. ZHAN, Zisheng. Strategies for high-level recombinant protein expression in transgenic microalgae: A review. **Biotechnology Advances**. V. 28. p.910-918. 2010.

POURAKBARI, Babak. KHODABANDEH, Mahmoud. MAHMOUDI, Shima. SABOUNI, Farah. AZIZ-AHARI, Alireza. BAHADOR, Abbas. VALIAN, Sepideh Keshavarz. SADEGHI, Reihaneh Hosseinpour. MAMISHI, Setareh. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* nasal colonization among patients and their parents /guardian in an Iranian referral hospital. **Microbial Pathogenesis**. V. 107. p.75-80. 2017.

PRABANDONO, Kurniadhi. AMIN, Sarmidi. Biofuel Production from Microalgae. Capítulo 10. Handbook of Marine Microalgae. **Biotechnology Advances**. p.145–158, 2015.

PRAGYA, Namita. PANDEY, Krishan K. SAHOO, P. K. A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. V. 24. p.159-171. 2013.

RASHID, Naim. REHMAN, Muhammad Saif Ur. MEMONB, Sheeraz. RAHMAN, Zia Ur. LEE, Kisay. HAN, Jong-In. Current status, barriers and developments in biohydrogen production by microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. V. 22, p.571–579. 2013.

RADAKOVITS, Randor. JINKERSON, Robert E. DARZINS, Al. POSEWITZ, Matthew C. Genetic Engineering of Algae for Enhanced Biofuel Production. **Eukaryotic Cell**. V. 9. p.486–501. 2010.

RAO, D. R. THANGAVEL, C. KABILAN, L. SUGUNA, S. MANI, T. R. SHANMUGASUNDARAM, S. Larvicidal properties of the cyanobacterium

Westiellopsis sp. (blue green algae) against mosquito vectors. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. V. 93. p.232. 1999.

REGLI, Anne Davin. PAGÈS, Jean-Marie. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. **Frontiers in Microbiology**. V. 6. p.1-10. 2015

RÖSCH, Christine. POSTEN, Clemens. Challenges and Perspectives of Microalgae Production. **Technikfolgenabschätzung – Theorie und Praxis** 21. V. 1. p.5-16. 2012.

SATYANARAYANA, K. G. MARIANO, A. B. VARGAS, J. V. C. A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. **International Journal of Energy Research**. V. 35. P.291-311. 2010.

SAVI, Daiani C. SHAABAN, Khaled A. VARGAS, Nathalia. PONOMAREVA, Larissa V. POSSIEDE, Yvelise M. THORSON, Jon S. GLIENKE, Chirlei. ROHR, Jürgen. *Microbispora* sp. LGMB259 Endophytic *Actinomycete* Isolated from *Vochysia divergens* (Pantanal, Brazil) Producing  $\beta$ -Carbolines and Indoles with Biological Activity. **Current Microbiology**. V. 70. p.345-354. 2015.

SHIMOGAWARA, Kosuke. FUJIWARA, Shoko. GROSSMAN, Arthur. USUDA, Hideaki. High-Efficiency Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by Electroporation. **Genetics Society of America**. V. 148. p.1821-1828. 1998.

SILVA, Lúcia Helena Sampaio da. Phytoplankton in an eutrophic reservoir (Lake Monte Alegre), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**. V. 59. p.281-303. 1999.

SING, Sophie Fon. ISDEPSKY, Andreas. BOROWITZKA, Michael A. MOHEIMANI, Navid Reza. Production of biofuels from microalgae. **Mitig Adapt Strateg Glob Change**. V. 18. p.47–72. 2013

SINGH, Jasvinder. GU, Sai. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. V. 14. p.2596-2610. 2010.

SINGH, Jasvinder. SAXENA, Rakesh Chandra. An Introduction to Microalgae: Diversity and Significance. **Handbook of Marine Microalgae**. 2015

SINGH, N. K. SONANI, R. R. RASTOGI, R. P. MADAMWAR, D. The phycobilisomes: an early requisite for efficient photosynthesis in cyanobacteria. **Experimental and Clinical Sciences Journal**. V. 14. p.268–289. 2015

SKJANES, Kari. REBOURS, Céline. LINDBLAD, Peter. Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. **Critical Reviews in Biotechnology**. V. 33. p.172-215. 2013.

SOUSA C. P. The Versatile Strategies of *Escherichia coli* Pathotypes: A Mini Review. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. V.12. p.363-373. 2006.

SUGANYA, T. VARMAN, M. MASJUKI, H. H. RENGANATHAN, S. Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. V. 55. p.909–941. 2016.

SUN, Y. YANG, Z. GAO, X. LI, Q. ZHANG, Q. XU, Z. Expression of foreign genes in *Dunaliella* by electroporation. **Molecular Biotechnology**. V. 30. p.185 - 192. 2005.

TIMMINS, M.; THOMAS-HALL, S. R.; DARLING, A.; et al. Phylogenetic and molecular analysis of hydrogen-producing green algae. **Journal of Experimental Botany**. V. 60, n. 6, p.1691–1702, 2009.

TOLONEN, Andrew C. LISZT, Gregory B. HESS, Wolfgang R. Genetic Manipulation of *Prochlorococcus* Strain MIT9313: Green Fluorescent Protein Expression from an RSF1010 Plasmid and Tn5 Transposition. **Applied and Environmental Microbiology**. V. 72. p.7607-7613. 2006.

TONG, Steven Y. C. DAVIS, Joshua S. EICHENBERGER, Emily. HOLLAND, Thomas L. FOWLER, Vance G. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Clinical Microbiology Reviews**. V. 28. p.603-661. 2015.

TONG, Yiqing. TANG, Jianguo. *Candida albicans* infection and intestinal immunity. **Microbiological Research**. V. 198. p.27–35. 2017.

TRENTACOSTE, Emily M. MARTINEZ, Alice M. ZENK, Tim. The place of algae in agriculture: policies for algal biomass production. **Photosynthesis Research**. V.123. p.305–315. 2015.

TRIPATHIA, Ritu. SINGHA, Jyoti. BHARTIA, Randhir kumar. THAKURA, Indu Shekhar. Isolation, Purification and characterization of lipase from *Microbacterium* sp. and its application in biodiesel production. **Energy Procedia**. V. 54. p.518-529. 2014

TSYGANKOV, Anatoly. KOSOUIROV, Sergey. SEIBERT, Michael. GHIRARDI, Maria L. Hydrogen photoproduction under continuous illumination by sulfur-deprived, synchronous *Chlamydomonas reinhardtii* cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**. V. 27. p.1239-1244. 2002.

VARGAS, J.V.C. MARIANO, A.B. CORRÊA, D.O. ORDONEZ, J.C. The microalgae derived hydrogen process in compact photobioreactors. **International Journal of Hydrogen Energy**. V. 39. p.9588-9598. 2014.

VISVALINGAM, Jeyachchandran. PALANIAPPAN, Kavitha. HOLLEY, Richard A. In vitro enhancement of antibiotic susceptibility of drug resistant *Escherichia coli* by cinnamaldehyde. **Food Control**. V. 79. p.288-291. 2017.

VU, John. CARVALHO, John. *Enterococcus*: review of its physiology, pathogenesis, diseases and the challenges it poses for clinical microbiology. **Frontiers in Biology**. V. 6. p.357–366. 2011.

WANG, Changhai. WANG, Yiyun. SU, Qiao. GAO, Xiaorong. Transient expression of the GUS gene in a unicellular marine green alga, *Chlorella* sp.MACC/C95, via electroporation. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**. V. 12. p.180-183. 2007.

WANNMACHER, Lenita. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: Uma Guerra perdida? Uso racional de medicamentos. V. 1, Nº 4 Brasília, Março de 2004. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/rede\\_rm/2007/2\\_060807/opas\\_1\\_uso\\_in\\_discriminado.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/rede_rm/2007/2_060807/opas_1_uso_in_discriminado.pdf). Acessado em 17/04/2017.

WIRTH, Roland. LAKATOS, Gergely. MARÓTI, Gergely. BAGI, Zoltán. MINÁROVICS, János. NAGY, Katalin. KONDOROSI, Éva. RÁKHELY, Gábor. KOVÁCS, Kornél L. Exploitation of algal-bacterial associations in a two-stage biohydrogen and biogas generation process. **Biotechnology for Biofuels**. Available online: 08 April 2015.

YAMASAKI, Katsutoshi. KOMATSU, Masaru. ONO, Tamotsu. NISHIO, Hisaaki. SUEYOSHI, Noriyuki. KIDA, Kaneyuki. SATOH, Kaori. TODA, Hirofumi. NISHI, Isao. AKAGI, Masahiro. MIZUTANI, Tetsu. NAKAI, Isako. KOFUKU, Tomomi. ORITA, Tamaki. ZIKIMOTO, Takuya. NAKAMURA, Tatsuya. WADA, Yasunao. Nosocomial spread of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing *bla*<sub>GES-4</sub> carbapenemase at a Japanese hospital. **Journal of Infection and Chemotherapy**. V. 23. p.40-44. 2017.

YANA, Chenghui. ZHANG, Yun. YANG, Hang. YUA, Junping. WEI, Hongping. Combining phagomagnetic separation with immunoassay for specific, fast and sensitive detection of *Staphylococcus aureus*. **Talanta**. V. 170. p.291–297. 2017.

YILMAZ, Fatih. BALTA, M. Tolga. SELBAS, Resat. A review of solar based hydrogen production methods. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. V. 56. p.171–178. 2016

ZHANG, Sen. LIU, Ping-huai. YANG, Xun. HAO, Zong-di. ZHANG, Ling. LUO, Ning. SHI, Jie. Isolation and identification by 18S rDNA sequence of high lipid potential microalgal species for fuel production in Hainan Dao. **Biomass and Bioenergy**. V. 66. p.197–203. 2014.

ZHAO, Lei. LI, Hongru. ZHU, Ziwen. WAKEFIELD, Mark R. FANG, Yujiang. YE, Ying. Genomic sequencing of a strain of *Acinetobacter baumannii* and potential

mechanisms to antibiotics resistance. **Infection, Genetics and Evolution**. V. 50. p.20–24. 2017.

ZHU, Liandong. Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: An innovative framework. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. V. 41. p.1376–1384. 2015.

ZIDA, A. BAMBA, S. YACOUBA, A. OUEDRAOGO-TRAORE, R. GUIGUENDÉ, R.T. Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review. **Journal de Mycologie Médicale**. V. 27, p.1—19. 2017.